

**Protein-Liganden-Modellentwicklung mittels „Higher-Order-Structure“-
Methoden und affinitätskapillarelektrophoretischen Bindungsstudien**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Markus Alexander Nachbar
aus Heidelberg

1. Referent:	<i>Prof. Dr. Hermann Wätzig</i>
2. Referent:	<i>Prof. Dr. Ingo Ott</i>
3. Referent:	<i>Prof. Dr. Gerhard Wolber</i>
eingereicht am:	05.12.2016
mündliche Prüfung (Disputation) am:	01.06.2017

Druckjahr 2017

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Nachbar, M., Mozafari, M., Krull, F., Maul, K.-J., Preu, L., Hara, M., Wätzig, H. (2017):
Metal ion – dehydrin interactions investigated by affinity capillary electrophoresis and computer models. *Journal of Plant Physiology*, 216, pp. 219-228

Hara, M., Monna, S., Nakano, T., Amano, S., Nachbar, M. and Wätzig, H. (2016):
The Arabidopsis KS-type dehydrin recovers lactate dehydrogenase activity inhibited by copper with the contribution of His residues. *Plant Science*, 245, pp. 135-142

Nachbar, M., El Deeb, S., Mozafari, M., Alhazmi, H. A., Preu, L., Redweik, S., Lehmann, W. D. and Wätzig, H. (2016):
Ca²⁺-complex stability of GAPAGPLIVPY peptide in gas and aqueous phase, investigated by affinity capillary electrophoresis and molecular dynamics simulations and compared to mass spectrometric results. *Electrophoresis*, 37 (5-6), pp. 744-751

Tagungsbeiträge

Nachbar, M., Alhazmi, H. A., Albishri, H. M., Abd El-Hady, D., El Deeb, S., Redweik, S., Wätzig, H.:
Fast screening for protein-ion interactions using Affinity Capillary Electrophoresis (Poster)
Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2013, Freiburg (2013)

Nachbar, M., Alhazmi, H. A., Redweik, S., Wätzig, H.:
Mobility shift Affinity Capillary Electrophoresis: A fast and precise screening method for protein interactions (Vortrag)
CE-Forum 2013, Jena (2013)

Nachbar, M., Mozafari, M., Alhazmi, H. A., Preu, L., Albishri, H. M., Abd El-Hady, D., El Deeb, S., Redweik, S., Wätzig, H.:
Fast and precise investigation of protein metal ion interactions using Affinity Capillary Electrophoresis
Drug Analysis 2014 – International Symposium on Drug Analysis, Liège (2014)

Nachbar, M., Mozafari, M., Alhazmi, H. A., Preu, L., Albishri, H. M., Abd El-Hady, D., El Deeb, S., Redweik, S., Wätzig, H.:
Affinity Capillary Electrophoresis to Investigate Metal Ion Interactions with the protein AtHIRD11 and the proline-rich peptide CBPep
EuroBIC 12 – 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Zürich (2014)

Nachbar, M., Mozafari, M., Alhazmi, H. A., Preu, L., Albishri, H. M., Abd El-Hady, D., El Deeb, S., Redweik, S., Wätzig, H.:

Binding studies under physiological conditions: Affinity Capillary Electrophoresis compared to other options

CE-Forum 2014, Marburg (2014)

Nachbar, M., Mozafari, M., Alhazmi, H. A., Preu, L., Albishri, H. M., Abd El-Hady, D., El Deeb, S., Redweik, S., Wätzig, H.:

Mobility Shift Capillary Electrophoresis: A fast and Suitable Method for Early Stage Protein Metal Ion Interaction Screening

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG) 2014, Frankfurt (2014)

Nachbar, M., Mozafari, M., Alhazmi, H. A., Preu, L., Redweik, S., El Deeb, S., Lehmann, W. D., Wätzig, H.:

GAPAGPLIVPY-Ca²⁺-Complex as an example for differences in observations in different techniques used for peptide-metal ion binding studies

42th Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques 2015, Genf (2015)

Nachbar, M., Voß, T., Dahlkamp, L., El Deeb, S., Wätzig, H.:

Investigating the impact of metal ion interactions with EOF-markers and buffer components on the result of mobility shift affinity capillary electrophoresis

CE-Forum 2015, Tübingen (2015)

Nachbar, M., Oltmann-Norden, I., Wätzig, H.:

Improved liquid antibody formulations by combination of in silico and analytical methods

Analytical Technologies Europe: Symposium on the Practical Applications including CE, LC and MS in the Biopharmaceutical Industry (AT Europe 2016), Wien (2016)

Nachbar, M., Oltmann-Norden, I., Wätzig, H.:

Improved liquid antibody formulations by combination of in silico and analytical methods

Gemeinsames Symposium des Zentrums für Pharmaverfahrenstechnik und der Fachgruppe

Arzneimittelkontrolle/Pharmazeutische Analytik der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2016, Braunschweig (2016)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Braunschweig, unter der Anleitung von Prof. Dr. Hermann Wätzig, verfasst. Ich danke ihm für die Möglichkeit zur Promotion, die freie Gestaltung des Themas und den vergangenen vier Jahren voller anregender Diskussionen.

Für die Übernahme des Koreferats danke ich Herrn Prof. Dr. Ingo Ott und ebenso Herrn Prof. Dr. Stephan Scherneck für die Leitung der Prüfungskommission herzlich.

Ganz herzlich danke ich für die schöne Zeit den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern des Arbeitskreises Wätzig Dr. Sabine Redweik, Dr. Sandra Grotefend, Dr. Hassan Alhazmi, Thomas Hahne, Tobias Rakow, Kai-Jorrit Maul, Mona Mozafari, Franziska Steinicke, Dr. Imke Oltmann-Norden, Friederike Krull und Julia Kahle. Ich danke auch dem Arbeitskreis El Deeb insbesondere Dr. Sami El Deeb für die Unterstützung, Mufarreh Asmari und Selin Öner für die gute Zusammenarbeit sowie die wundervollen Momente.

Des Weiteren gilt mein Dank auch meinen ehemaligen Wahlpflichtstudenten, insbesondere Frau Julia Kahle, Frau Luisa Dahlkamp und Frau Tomke Voß für die netten und unterhaltsamen Stunden.

Auch möchte ich für die gute Zusammenarbeit bei der Praktikumsbetreuung Dr. Johann Grünefeld, Katharina Schuller, Dr. Désirée Baumann, Annkathrin Weißenborn, Marion Wiggermann, Shantheya Balasupramiam, Mona Mozafari, Anke Schulz und Svenja Patz. Es war eine aufregende und meist heitere Zeit während der Betreuung der Studierenden des 1. Semesters.

Für die anregenden und häufig hitzigen Diskussionen im „Kaffeeraum“ möchte ich besonders Dr. Hans-Otto Burmeister, Petra Reich und Sandra Meyer sowie den unregelmäßigen Teilnehmern der Kaffeepause danken.

Für die Unterstützung bei der Reparatur der verwendeten CE-Geräte danke ich Frank Riese und Eduard Hinz.

Ich danke Dr. Lutz Preu für die Unterstützung in der Erarbeitung der Grundlagen des Molekular Modellings, die Diskussionen und die Betreuung während der Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik. Auch danke ich Frau Dr. Imke Oltmann-Norden für die gute Zusammenarbeit, die netten Stunden und interessanten Gespräche. Beiden danke ich besonders für das fleißige und gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zum Schluss danke ich meiner Familie für die Unterstützung, nicht nur während der Promotionszeit, sondern auch während meines Studiums.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iv
Symbole	xiii
1. Einleitung und Aufgabenstellung	1
2. Proteine	3
2.1. Allgemeiner Aufbau	3
2.1.1. Aminosäuren	3
2.1.2. Strukturelemente	4
2.1.3. Antikörper	6
2.2. Agglomeration, Aggregation, Fragmentierung und destabilisierende Faktoren von Antikörper	7
2.2.1. Stabilisatoren	9
2.2.3. Methoden zur Antikörperstabilitätsuntersuchung	12
3. Bioanorganische Komplexe und Protein-Metallionen-Interaktionen	15
3.1. Physiologische und pathologische Aspekte	15
3.2. Relevanz von Metall-Protein-Interaktionen	15
3.3. Grundlagen der Koordinationschemie	16
3.3.1. Ligandenfeldtheorie	17
3.3.2. Konzept der „Hard and soft acids and basis“ (HSAB-Konzept)	20
3.4. Metalloproteine	21
4. Kapillarelektrophorese	25
4.1. Physikalische Grundlagen der elektrophoretischen Trennung	25
4.2. Techniken der kapillarelektrophoretischen Trennung	26
4.2.1. Kapillarzonelektrophorese	27
4.3. Affinitätselektrophoretische Methoden	28
4.3.1. Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophorese	28

4.3.2. Besonderheiten der Untersuchung von Protein-Metallionen-Wechselwirkungen	29
4.3.2.1. Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Metallionen und EOF-Marker	30
5. Molecular Modeling.....	34
5.1 Grundlagen der Methoden des Molecular Modelings	34
5.2. Methoden zur Modellentwicklung.....	34
5.2.1. Prinzipien der molekülmechanischen Berechnungen.....	34
5.2.2. Physikalische Grundlagen und Einsatzgebiete von ab-initio-Methoden.....	39
5.2.2.1. Die Hartree-Fock-Approximation.....	41
5.2.2.3. Die Dichtefunktionaltheorie	43
5.2.2.3. Semi-empirische Methoden	44
5.3. Moleküldynamische Simulationen.....	45
5.3.1. Prinzipien der Moleküldynamischen Simulation	45
5.3.2. Charakteristika eines simulierten Systems	46
5.3.3. Vorbereitung der Simulation	47
5.3.4. Auswertung der Simulation	50
5.4. Vorhersagen von Struktur und physikochemischen Eigenschaften von Proteinen	52
5.4.1. Homologiemodellierung	53
5.4.1.1 Erstellung von Homologiemodellen	53
5.4.1.2 Validierung von Homologiemodellen	53
5.4.2. Weitere Methoden in der Modellentwicklung	55
5.4.2.1. Stochastische Methoden.....	55
5.4.2.2. Clusteranalyse	55
5.4.2.3. Free Energy Perturbation.....	56
6. Das Peptid GAPAGPLIVPY	57
6.1. Galectin-3 und seine physiologischen Funktionen	57

6.2. Vorangehende Experimente	58
6.3. Ergebnisse der Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophoreseuntersuchungen.....	59
6.4. Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse mittels in-silico-Methoden	61
7. Das pflanzliche Protein AtHIRD11.....	64
7.1. Herkunft und Eigenschaften des Proteins AtHIRD11	66
7.2. Ergebnisse aus Interaktionsstudien	69
7.2.1. Affinitätschromatographische und zirkulardichroistische Ergebnisse für AtHIRD11	69
7.2.2. Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophoretische Ergebnisse für AtHIRD11.....	70
7.3. Erstellung und Verfeinerung eines Homologie-Modells.....	75
7.3.1 Das Kupfer(II)-AtHIRD11-Modell	78
8. Die Domänen D1 und D6 des Proteins AtHIRD11	84
8.1. Gründe für Untersuchung der beiden Domänen.....	85
8.2. Experimentelle Ergebnisse der Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophorese.....	85
8.3. Modellierte Komplexe	91
8.3.1. Molekülmechanische Modelle.....	91
8.3.2. Semi-empirisch berechnete Modelle	94
9. Einblicke in den möglichen Mechanismus der Stabilisierung von Antikörpern durch Hilfsstoffe anhand von Trastuzumab mittels computerchemischen Methoden.....	97
9.1. Trastuzumab und seine Bedeutung als Modellantikörper	97
9.2. Auswahl der Hilfsstoffe	97
9.3. Berechnung der Hydrophobizitätszentren	98
9.4. Docking der Hilfsstoffe an den Antikörper	99
9.5. Stabilitätsuntersuchungen mittels moleküldynamischer Simulation	102
10. Zusammenfassung	107
11. Experimenteller Teil	111
11.1. Instrumentierung und Software für kapillarelektrophoretische Experimente	111

11.2. Kapillaren	111
11.3. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	112
11.3.1. Herstellung der Konditionierungs- und Spüllösungen	112
11.3.2. Pufferherstellung	113
11.3.3. Herstellung der EOF-Marker-Lösungen.....	113
11.3.4. Herstellung der Peptid- und Proteinlösungen	113
11.3.5. Herstellung der metallionenhaltige Pufferlösungen (Hintergrundelektrolytlösungen).....	114
11.4. Verwendete kapillarelektrophoretische Methoden	114
11.4.1. Methoden der GAPAGPLIVPY-Experimente	114
11.4.2. Methoden der D1- und D6-Domänenuntersuchungen	115
11.4.3. Methoden zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen EOF-Markern und Metallionen.....	117
11.5. Auswertung der kapillarelektrophoretischen Untersuchungen	117
11.6. Instrumentierung und Software für computerchemische Untersuchungen	121
11.7. Computerchemische Untersuchungen	122
11.7.1. Methoden zur Modellerstellung	122
11.7.2. Methoden zur Qualitätsprüfung von computerchemischen Modellen.....	123
12. Literaturverzeichnis	126

Abkürzungsverzeichnis und Symbole

Abkürzungen

ACE	Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophorese
ADC	„Antibody drug conjugate“, dt.: Antikörper-Arzneistoff-Konjugat
AO	Atomorbital
BGE	„Background electrolyte“, dt.: Hintergrundelektrolytlösung
CD	„Circular dichroism“, dt.: Zirkulardichroismus
CDR	„complementary determining region“, dt.: komplementaritätsbestimmende Region
CGE	„Capillary gel electrophoresis“, dt.: Kapillargelelektrophorese
C _H 1	„heavy chain constant domain 1“, dt.: konstante Region der schweren Kette
CHO-Zellen	„Chinese hamster ovaria cells“, dt.: Ovarialzellen des chinesischen Hamsters
CIEF	„Capillary isoelectric focusing“, dt.: kapillarisoelektrische Fokussierung
cITP	„capillary isotachophoresis“, dt.: kapillare Isotachophorese
C _L	„light chain constant domain“, dt.: konstante Region der leichten Kette
CNDO	„Complete Neglect of Differential Overlap“, dt.: Vollständige Vernachlässigung von Überlappungsdifferentialen
CS	„charge solvation“, dt.: Ladungssolvatisierung
CT	„Charge-Transfer“, dt.: Ladunstransfer
CZE	„Capillary zone electrophoresis“, dt.: Kapillarzonenlektrophorese
DAD	Dioden-Array-Detektor
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOF	Elektroosmotischer Fluss
FA	„Frontal analysis“-Affinitätskapillarelektrophorese
Fab	„Fragment antigen binding“, dt.: Antigen-bindende Fragment
Fc	„Fragment, cristallizable“, dt.: kristallisierbares Fragment
FL	Fluoreszenzspektroskopie
FT-IR	Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAPAG	Kurzform von GAPAGPLIVPY (Einbuchstabencode des entsprechenden Peptids)
HD	Hummel-Dreyer-Affinitätskapillarelektrophorese
HF-Approximation	Hatree-Fock-Annäherung
HIC	„Hydrophobic interaction chromatography“, dt.: hydrophobe Interaktionschromatographie
HILIC	„Hydrophilic interaction liquid chromatography“, dt.: hydrophile Interaktionsflüssigchromatographie
HOMO	„Highest occupied molecule orbital“, dt.: höchstes, besetztes Molekülorbital
HOS	„Higher order structures“, dt.: höhere (Protein)Strukturen
HPLC	„High performance liquid chromatography“, dt.: Hochleistungsflüssigchromatographie
HSAB	„Hard and soft acids and basis“, dt.: harte und weiche Säuren und Basen
HSQC	„Heteronuclear Single Quantum Correlation“, dt.: Heteronuclear korrelierte Kernspinresonanzspektroskopie
ICH	„International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Human Use“
iCIEF	„imaged Capillary isoelectric focusing“, dt.: bildgebende kapillarisoelektrische Fokussierung
IDP	„Intrinsically disordered Proteins“, dt.: intrinsisch ungeordnete Proteine

LEX	„Ion exchange chromatography“, dt.: Ionenaustauschchromatographie
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin Typ A
IgD	Immunglobulin Typ D
IgE	Immunglobulin Typ E
IgG	Immunglobulin Typ G
IgM	Immunglobulin Typ M
INDO	„Intermediate Neglect of Differential Overlap“, dt.: Intermediäre Vernachlässigung von Überlappungsorbitalen (Vernachlässigung der Überlappungsintegrale von Elektronen, die nicht am selben Atom lokalisiert sind)
KZ	Koordinationszahl
LEA	„Late embryogenesis abundant protein“, dt.: Protein der späten (pflanzlichen) Embryogenese
LUMO	„Lowest unoccupied molecule orbital“, dt.: niedrigstes, unbesetztes Molekülorbital
MD	Molekulardynamisch
MM	Molekülmechanik
MO	Molekülorbital
MOE	„Molecular Operating Environment“; Programm zum Modellieren und Analysieren von Molekülen
mRNS	„Messenger“-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektroskopie
MTTK	Martyna-Tucker-Tobias-Klein-Barostat
NanoESI	Nanoelektronensprayionisator (Ionisationsmethode mit geringem Probenverbrauch)
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NDDO	„Neglect of Diatomic Differential Overlap“, dt.: Vernachlässigung von Zweiatomüberlappungsintegrale
NMA	N-Methylacetamid

NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NpT	Isothermisch-isobares Ensemble (Teilchenzahl, Druck und Temperatur bleiben konstant)
NVE	Mikrokanonisches Ensemble (Teilchenzahl, Volumen und Gesamtenergie bleiben konstant)
NVT	Kanonisches Ensemble (Teilchenzahl, Volumen und Temperatur bleiben konstant)
PAP-Score	„protein aggregation propensity“-Score, dt.: Proteinaggregationswahrscheinlichkeitsscore
PM3	„Parametric Method 3“
PM7	„Parametric Method 7“
QM	Quantenmechanische Methode
QSAR	„Quantitative structure activity relationship“, dt.: quantitative Struktur-Wirkungsbeziehung
QTOF	Quadrupol-„Time-Of-Flight“-Analysator
RMSD-Wert	„Root mean square deviation“, dt.: Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung; Maß für die Abweichung einer Struktur von einer Referenzstruktur [Å]
RMSF-Wert	„Root mean square fluctuation“, dt.: Wurzel der mittleren quadratischen Fluktuation; Maß für die zeitliche Abweichung einer Struktur von einer Referenzstruktur [Å]
ROS	„Reactive oxygen species“, dt.: reaktive Sauerstoffspezies
RPLC	„Reverse phase liquid chromatography“, dt.: Umkehrphasenflüssigchromatographie
SAXS	Kleinwinkelröntgenstreuung
SDS-PAGE	„Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“, dt.: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	„Size exclusion chromatography“, dt.: Größenausschlusschromatographie
SPC	„Single point charge“, dt.: Punktladungsmodell
SPC/E	„Extended single point charge“, dt.: erweitertes Punktladungsmodell

TIPxP (x = 3, 4, 5)	„Transferable intermolecular potential function with 3, 4, 5 interactions sites“, Modell mit 3, 4 bzw. 5 atomiges Wassermolekül (einschließlich Wasserstoffbrücken)
TMAO	Trimethylaminoxid
TOCSY	„Total Correlation Spectroscopy“, dt.: totale Korrelationsspektroskopie
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VACE	„Vacancy affinity capillary electrophoresis“-Affinitätskapillarelektrophorese
V _H	„heavy chain variable domain“, dt.: variable Region der schweren Kette
V _L	„light chain variable domain“, dt.: variable Region der leichten Kette
VP	„Vacancy peak“-Affinitätskapillarelektrophorese

Drei- und Einbuchstabencode für Aminosäuren

Tabelle 1 Übersicht über proteinogene Aminosäure und übliche Kurzbezeichnungen im 1- und 3-Buchstabencode

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Pyrrolysin	Pyl	O
Selenocystein	Sec	U
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Symbole

d_{ij}	Abstand zwischen den Atomen i und j [m]
d^0	Distanz mit Energieminimum der Van-der-Waals-Wechselwirkungen [m]
E	Energieeigenwertmatrix [J]
$E[\rho]$	Funktional der Gesamtenergie eines Moleküls in Abhängigkeit der Elektronendichte ρ $\left[\frac{Nm}{mol}\right]$
E_b	Bindungslängendeformationsenergie $\left[\frac{J}{mol}\right]$
$E_{b\theta}$	Wechselwirkungsterm für Bindungslängen- und Bindungswinkeldeformationsenergie $\left[\frac{J}{mol}\right]$
E_{hb}	Wasserstoffbrückenenergie $\left[\frac{J}{mol}\right]$
E_{nb}	Van-der-Waals-Energie $\left[\frac{J}{mol}\right]$
$E_{xc}[\rho]$	Funktional der Austausch-Korrelationsenergie der Elektronendichte ρ $\left[\frac{Nm}{mol}\right]$
E_δ	Nicht-Planaritätsenergie $\left[\frac{J}{mol}\right]$
E_ε	Coulomb-Energie $\left[\frac{J}{mol}\right]$
E_θ	Bindungswinkeldeformationsenergie $\left[\frac{J}{mol}\right]$
E_ϕ	Torsionswinkelenergie $\left[\frac{J}{mol}\right]$
F	Kraft [N]
\hat{H}	Hamilton-Operator
h	Höhe [m]
\hbar	reduziertes Planck'sches Wirkungsquantum [$N * m * s$]

i	Atom i
j	Atom j
k	Atom k ; Kraftkonstante $\left[\frac{C \cdot V}{m^2}\right]$
k_b	Kraftkonstante für chemische Bindung $\left[\frac{N}{mol \cdot m}\right]$
k_θ	Kraftkonstante für Bindungswinkeldeformation $\left[\frac{J}{mol \cdot rad^2}\right]$
k_ϕ	Barriereenergie zur Drehung um den Torsionswinkel $\left[\frac{J}{mol}\right]$
l_c	Gesamtlänge der Kapillare $[m]$
l_d	Länge der Kapillare bis Detektor $[m]$
l_U	Entnommen aus der Formel des Originalartikels von Křížek <i>et al.</i> ; Aus dem Text geht hervor, dass es sich um t_u handeln muss.
M	Summe der Atommassen von i bis N eines Moleküls $[g]$
m	Periodizität; Masse $[g]$
m_i	Masse des i -ten Atoms innerhalb eines Moleküls $[g]$
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis $\left[\frac{g}{c}\right]$
N	Nummer eines Elektrons bzw. seiner Wellenfunktion; Teilchenzahl $[mol]$; Anzahl der Atome innerhalb eines Moleküls
n_f	Anzahl der unabhängigen Messungen der Migrationszeit des EOF-Markers in Abwesenheit von Metallionen im Puffer
n_i	Anzahl der unabhängigen Messungen der Migrationszeit des EOF-Markers in Anwesenheit von Metallionen im Puffer; Gesamtzahl der unabhängigen Messungen

p	Druck [<i>bar</i>]
ϕ	Winkel am α -Kohlenstoffatom eines Aminosäurerests in einem Peptid bzw. Protein [$^{\circ}$]
ψ	Winkel am α -Kohlenstoffatom eines Aminosäurerests in einem Peptid bzw. Protein [$^{\circ}$]
p_0	Referenzdruck [<i>bar</i>]
q_D	Ladung des Atoms D [C]
q_{eff}	effektive Ladung des Teilchens [C]
q_i	Ladung des Atoms i [C]
q_j	Ladung des Atoms j [C]
R	Normalisierte Migrationszeit des Analyten
R_f	Normalisierte Migrationszeit in Abwesenheit des Liganden
$RMSD$	Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung einer Struktur [\AA]
$RMSF_i$	Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung einer Struktur von ihrem zeitlichen Mittel [\AA]
r	effektiver Radius des Teilchens [m]; Position
\vec{r}	Ortsvektor
r_i	Position des i -ten Atoms der Struktur in Bezug auf den Massenschwerpunkt [\AA]
r_i^{ref}	Koordinaten des i -ten Atoms der Referenzstruktur [\AA]
r_{ij}	Distanz zwischen den Atomen i und j [m]
r_o	Ideale Distanz zwischen den Atomen i und j [m]
T	Temperatur [K]; Zeitspanne [s]

T_0	Referenztemperatur eines Wärmebades [K]
$T_0[\rho]$	Funktional der kinetische Energie von Elektronen eines Systems, das dieselbe Elektronendichte hat wie das zu beschreibenden System (ohne Elektron-Elektron-Wechselwirkungen) $\left[\frac{\text{Nm}}{\text{mol}}\right]$
t_{adj}	Adjustierte Migrationszeit [s]
t_{Analyt}	Migrationszeit des Analyt [s]
t_{EOF}	Migrationszeit des EOF-Markers [s]
t_f	Adjustierte Migrationszeit des EOF-Markers in Abwesenheit von Metallionen [s]
$t_{f,Analyt}$	Migrationszeit des Analyten in Abwesenheit von Metallionen [s]
$t_{f,EOF}$	Migrationszeit des EOF-Markers in Abwesenheit von Metallionen [s]
t_{H_2O}	Migrationszeit des negativen Wasserpeaks [s]
t_i	Adjustierte Migrationszeit des EOF-Markers in Anwesenheit von Metallionen [s]
$t_{i,Analyt}$	Migrationszeit des Analyten in Anwesenheit von Metallionen [s]
$t_{i,EOF}$	Migrationszeit des EOF-Markers in Anwesenheit von Metallionen [s]
t_j, t_1	Struktur eines Moleküls zum Zeitpunkt t
t_M	Migrationszeit der ersten EOF-Markerinjektion [s]
t_{M2}	Migrationszeit der zweiten EOF-Markerinjektion [s]
t_S	Migrationszeit des Analyten [s]
t_u	Zeitraum über den die Spannung angelegt wurde [s]

$t_{\alpha/2, \sum_1^i(n_i)-i}$	Quantile der t -Verteilung für Anzahl der Freiheitsgrade aller Messreihen
$t_{\alpha/2, n_i+n_f-2}$	Quantile der t -Verteilung für Anzahl der Freiheitsgrade $n_i + n_f - 2$
t_2	Referenzstruktur eines Moleküls
U	elektrische Spannung [V]; potentielle Energie [J]
U_{Gesamt}	Gesamte Verzerrungsenergie $\left[\frac{J}{mol}\right]$
$\hat{U}_{el}(r)$	Coulomb-Potential zwischen Elektronen im Raum $r \left[\frac{C}{m}\right]$
$\hat{V}_{ext}(r)$	Externes Potential im Raum $r \left[\frac{C}{m}\right]$
v	Geschwindigkeit $\left[\frac{m}{s}\right]$
x	Variabel für Koordinaten bei molekulardynamischen Simulationen
α	Polarisierbarkeit $\left[\frac{C*m^2}{V}\right]$
Δ	Laplace-Operator
$\Delta R/R_f, \frac{\Delta R}{R_f}$	Wert, der die normalisierte Änderung des Größe-Ladungsverhältnisses angibt
Δt	Migrationszeitunterschied [s]
$\Delta\mu_{salt}^{S,M}$	Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität zwischen dem Analyten und dem EOF-Marker in Anwesenheit eines Metallsalzes $\left[\frac{m^2}{V*s}\right]$
ϵ_0	Dielektrizitätskonstante $\left[\frac{A*s}{m*V}\right]$
η	Viskosität der Lösung $\left[\frac{kg}{m*s}\right]$
θ_{ijk}	Bindungswinkel zwischen den Atomen i, j und k [rad]

θ_0	Idealer Bindungswinkel zwischen den Atomen i, j und k [rad]
μ	Elektrophoretische Mobilität $\left[\frac{m^2}{V \cdot s}\right]$
μ_{salt}^M	Elektrophoretische Mobilität des EOF-Markers in Anwesenheit eines Metallsalzes $\left[\frac{m^2}{V \cdot s}\right]$
μ_{salt}^S	Elektrophoretische Mobilität des Analyten in Anwesenheit eines Metallsalzes $\left[\frac{m^2}{V \cdot s}\right]$
σ_{Gesamt}	Gesamtfehler
$\sigma_{t_{f, EOF}}$	Standardabweichung von t bei der Messung des EOF-Markers in Abwesenheit von Metallionen [s]
$\sigma_{t_{i, EOF}}$	Standardabweichung von t bei der Messung des EOF-Markers in Anwesenheit von Metallionen [s]
$\sigma_{t_{i, H_2O}}$	Standardabweichung von t bei der Messung des Wasser-Peaks in Anwesenheit von Metallionen [s]
$\sigma_{t_{f, H_2O}}$	Standardabweichung von t bei der Messung des Wasser-Peaks in Abwesenheit von Metallionen [s]
τ	Zeitschritt [s]
τ_p	Druckkopplungszeitkonstante [s]
ρ	Elektronendichte $\left[\frac{mol}{m^3}\right]$
Φ_{SD}	Slater-Determinante
ϕ_{ijkl}	Torsionswinkel zwischen den Atomen i, j, k und l [rad]
$\phi_{Phasenverschiebung}$	Phasenverschiebung des Energieminimums des Torsionswinkels von der gestaffelten Konformation [rad]
$\chi_N(\vec{X}_N)$	Spin-Orbital des Elektrons N (Produkt aus dem Teilorbital

Φ_N und einer der beiden orthonormalen Spin-Funktionen α oder β)

ψ Winkel [*rad*]

Ψ Wellenfunktion Ψ

Ψ_0 Wellenfunktion eines gesamten Moleküls

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Die zunehmende Automatisierung und die drastisch schneller werdenden Sequenzierungsmethoden für Genome unterschiedlicher Spezies führten in den vergangenen Jahren zu einer Unzahl an entschlüsselten Genen und zur Identifikation der von ihnen codierten Proteine [1]. Man findet diese Ergebnisse in unterschiedlichen Proteindatenbanken, wie z. B. die RCSB Protein Data Bank, die UniProt- und die Swiss-Prot-Datenbank, zusammengefasst. Diese Datenbanken enthalten unterschiedliche Informationen dieser Proteine, z. B. ob die Struktur aufgeklärt ist, oder ob das Protein nur anhand seines Gens oder der fertigen Vorlage, der sogenannten mRNA (*messenger Ribonukleinsäure*), identifiziert wurde.

Vergleicht man die Anzahl der Einträge in der UniProt-Datenbank für identifizierte Proteine (68.493.254 Proteine; Stand: 18.10.2016) mit der Anzahl der aufgeklärten Proteinstrukturen aus der RCSB Protein Data Bank (120.437 Proteine und Protein-Nukleinsäure-Komplexe; Stand: 18.10.2016), so findet man eine große Diskrepanz zwischen Proteinen, deren Struktur aufgeklärt sind, und Proteinen, die man zwar kennt und untersucht hat, deren Struktur aber noch nicht aufgeklärt ist [2, 3].

Der Grund, weshalb ein großer Teil der bekannten Proteine noch nicht strukturaufgeklärt ist, sind die dazu erforderlichen sehr zeitaufwändigen und arbeitsintensiven Techniken. Da allerdings für bestimmte Untersuchungen von Proteinen, wie z.B. mögliche Interaktionspartner und die Erforschung ihrer Funktion, kein detailliertes Wissen über die eigentliche dreidimensionale Struktur des Proteins notwendig ist, findet man auch häufig eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die sich mit diesen oder anderen Eigenschaften beschäftigen.

Aber diese Erkenntnisse sind nicht genügend um Proteine vollständig zu beschreiben. Es können keine Detailinformationen wie z. B. der Reaktionsmechanismus einer enzymatischen Funktion oder die Aktivierung bzw. Deaktivierung von Funktionen durch chemische Modifikationen bzw. Interaktionen, präzise beschrieben werden. Zur Erklärung dieser Sachverhalte werden 3D-Modelle benötigt, die man mit Hilfe von bioinformatischen Methoden erstellen kann, wie die Erstellung von Homologiemodellen mittels bereits aufgeklärten Strukturen und Strukturelementen, die über identische Aminosäuresequenzen hinausgehen.

Diese Strukturelemente werden auch als „higher order structures“ (HOS) bezeichnet und können nicht nur durch die Bioinformatik vorhergesagt werden, sondern zusätzlich durch unterschiedliche experimentelle Methoden bestimmt werden [4, 5]. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die dreidimensionale Struktur eines Proteins und somit auch seine Eigenschaften, nicht nur von ihrer Aminosäuresequenz abhängig sind, sondern auch von ihrer Umgebung. Faktoren wie pH-Wert, Lösungsmittel, Ionenstärke aber auch die Anwesenheit bestimmter Ionen spielen eine entscheidende Rolle und können die HOS beeinflussen [6].

Um den Einfluss von Ionen auf Proteine zu untersuchen eignet sich die Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophorese (ACE), da hierbei sowohl ionenbedingte Änderungen in der Gesamtladung als auch konformative Änderungen in Form von Änderungen der Gesamtgröße des Proteins evaluiert werden können. Des Weiteren können Aussagen über die Bindungsstellen von Metallionen getroffen werden, die in dieser Arbeit genauer erläutert werden [7].

Aus diesen Gründen befasst sich die vorliegende Abhandlung mit der Untersuchung der Wechselwirkungen von Proteinen bzw. Peptiden mit Metallionen mittels Affinitätskapillarelektrophorese sowie den Einfluss von Metallionen auf den Messprozess. Des Weiteren findet eine Beschreibung der Protein-Metallionen-Komplexe mittels computerchemischen Modellen statt, die genutzt werden, um in der Literatur bereits beschriebene Phänomene ausgewählter Proteine zu visualisieren und zu erklären. Auch wird die Modellentwicklung auf die Interaktionen zwischen einem monoklonalen Modellantikörper mit unterschiedlichen Hilfsstoffen ausgedehnt.

2. Proteine

Proteine bilden unter den biologischen Makromolekülen die vielseitigste Gruppe. Ihre Funktionen reichen von strukturgebenden und Bewegungen ermöglichenden Bausteinen über Transportsysteme, die Weitergabe von Signalen durch Interaktion mit anderen Proteinen bzw. Biomolekülen, die katalytische Umsetzung von Stoffen und Erzeugung von mechanischen sowie elektrochemischen Kräften bis hin zur Wachstumssteuerung und Abwehr von körperfremden Stoffen. Sie gehören somit zu den wichtigsten Stoffen in biologischen Organismen [8, 9].

2.1. Allgemeiner Aufbau

Die Funktion von Proteinen hängt im Wesentlichen von ihrer dreidimensionalen Struktur ab. Diese wird fundamental durch die Abfolge ihrer monomeren Bausteine, den Aminosäuren, bestimmt. Diese Struktur bildet sich bereits bei ihrer Synthese aus und deren Bildung kann in speziellen Fällen von weiteren Proteinen, sogenannte Chaperone, unterstützt werden. Es werden teilweise Proteine durch Glykosylierungen, Phosphorylierung sowie weitere Modifikationen auch postranslational, d.h. nach der Übersetzung des genetischen Codes in eine Abfolge von Aminosäuren, verändert [8–11].

2.1.1. Aminosäuren

Proteine sind Polymere, die aus immer wiederkehrenden Monomeren, den Aminosäuren, bestehen. Diese Monomere zeichnen sich durch einen gemeinsamen Grundkörper aus. Proteinogene Aminosäuren, also Aminosäuren, die in Proteinketten eingeführt werden, sind in der Regel *L*-Isomere von α -Aminocarbonsäuren mit der stereochemischen Konfiguration *S*. Die Ausnahme bilden *L*-Cystein und *L*-Selenocystein, da in der CIP-Nomenklatur der Schwefel eine höhere Priorität besitzt als Sauerstoff. Sie werden für die Beschreibung von Peptiden und Proteinen ausgehend von der terminalen Aminfunktion der Kette (N-Terminus) nummeriert. Je nach pH-Wert liegt entweder die Carboxylgruppe deprotoniert oder die Aminofunktion protoniert vor und bestimmt somit die Nettoladung. Aufgrund der Deprotonierbarkeit der Carbonsäure- und der Protonierbarkeit der Aminofunktion liegt, bei einem bestimmten pH-Wert, ein gleicher Anteil der beiden funktionellen Gruppen im geladenen Zustand vor. Diese Form nennt man Zwitterionenform und der dazugehörige pH-Wert wird isoelektrischer Punkt genannt [8–11].

Eine weitere Unterteilung der Aminosäuren nach ihren physikochemischen Eigenschaften in unpolare, nicht geladene aber polare und geladene, polare Seitenketten findet häufig statt [9]. Obwohl es unzählige *L*- α -Aminosäuren gibt, werden bei der Proteinbiosynthese gerade einmal 20 verschiedene Aminosäuren zu Proteinen kondensiert (**Tabelle 1**). Diese proteinogenen Aminosäuren können nach der Synthese an ihren unterschiedlichen Resten unterschiedlich modifiziert werden. Erwähnenswert ist hierbei die Oxidation von zwei Cysteinen unter Ausbildung einer Disulfid-Brücke, da diese Modifikation verschiedene Aminosäureketten kovalent miteinander vernetzen kann und somit übergeordnete Strukturen entscheidend prägt [8–11].

Weitere Funktionen von proteinogene Aminosäuren sind, neben Funktion in der Proteinbiosynthese, ihre Rolle in der Synthese bzw. ihre Wirkung als Neurotransmitter und Hormone, wie z.B. γ -Aminobuttersäure (GABA), Histamin, Glutamat, Dopamin und Thyroxin [8, 9, 12, 13]. Des Weiteren finden sich einige *D*-Aminosäuren in verschiedenen Organismen wieder. Sie werden von

ihnen synthetisiert und in Peptide eingebaut, hier sind besonders die bakteriellen Peptidantibiotika Valinomycin, Gramicidin A und Actinomycin D zu erwähnen [9].

2.1.2. Strukturelemente

Wie bereits beschrieben, spielt die dreidimensionale Struktur der Proteine eine fundamentale Rolle. Die Organisation von Proteinen kann in unterschiedliche Organisationsebenen eingeteilt werden. Ausgehend von der Sequenz der Aminosäuren (Primärstruktur) über bestimmte Ordnungsstrukturen innerhalb einer Aminosäurekette (Sekundärstruktur) und die Gesamtheit der räumlichen Anordnung dieser einen Kette (Tertiärstruktur) bis hin zu der dreidimensionalen Anordnung mehrerer Aminosäureketten zu einem Gesamtprotein (Quartärstruktur) werden Proteine in der Regel beschrieben [8–11].

Außer diesen Grundstrukturmerkmalen kann die Struktur und Funktion von Proteinen noch zusätzlich von Nichtprotein-Anteilen geprägt sein. Hier werden nicht kovalent gebundene Stoffe, wie Metallionen oder kleine Moleküle, wie Nicotinamidadenindinukleotid (NAD), die als Cofaktoren dienen, von kovalent gebundenen organischen Strukturen, wie z. B. Häm-Gruppen, die als prosthetische Gruppe bezeichnet werden, unterschieden [9].

Die Primärsequenz eines Proteins ist grundlegend für die Bildung übergeordneter Strukturen. Sie gibt vor, welche Sekundärstrukturen gebildet werden können und lässt somit eine Vorhersage dieser zu [14]. Ältere Literatur beschreiben als Sekundärstrukturmerkmale lediglich die aus regelmäßig wiederholten Elementen bestehenden α -Helix- und β -Faltblattstrukturen. Mittlerweile wurden weitere Merkmale, die zwar keine Periodizität aufweisen, aber häufig auftreten und gut definierbar sind, mit in die Liste aufgenommen. Hierbei handelt es sich um die Haarnadelkehre („ β -turn“ oder auch β -Schleife), die seltener auftretende γ -Schleife und die Ω -Schleife [8, 15].

α -Helices zeichnen sich durch ihre Einheitlichkeit hinsichtlich ihrer Ganghöhe und ihrer Krümmung aus und weisen meist nur etwa zehn Aminosäuren auf. Bei längeren Helices bilden sich häufig auch übergeordnete (Tertiär-) Strukturen aus, sowie die in sich verdrehte α -Helix („coiled coils“) [16]. Das β -Faltblatt zeichnet sich vor allem durch eine vollständige Nutzung der Wasserstoffbrückenkapazität zwischen zwei Peptidsträngen in räumlicher Nähe aus. Hierbei können die Peptide in dieselbe Richtung verlaufen oder gegenläufig ausgerichtet sein. Sie können, wie α -Helices, weitere übergeordnete Proteinmotive bilden, sogenannte β -Fässer (**Abbildung 1** (d)) [8–11].

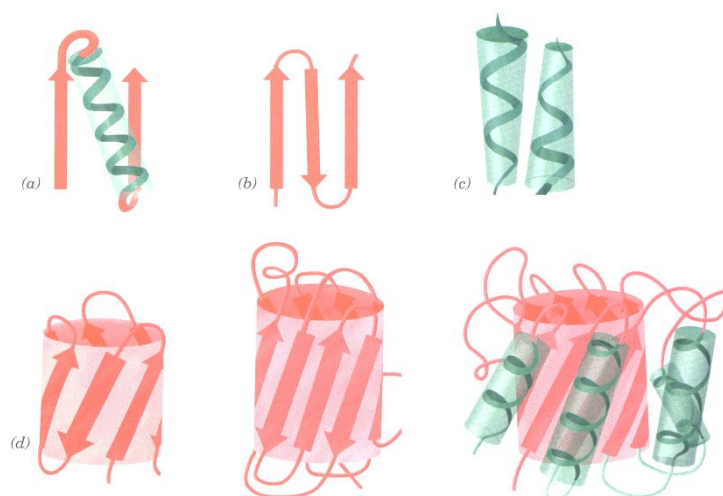


Abbildung 1 Proteinmotive entnommen aus Voet *et al.* (a) $\beta\alpha$ -Motiv (b) β -Schleife (c) $\alpha\alpha$ -Motiv (d) unterschiedliche β -Fass-Strukturen [9].

Die β - und γ -Schleifen sind Strukturelemente, welche die Richtung in der Polypeptidketten verlaufen, umkehren. Sie bilden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidbindungen aus. Im Fall der β -Schleife besteht diese aus vier Aminosäuren mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der ersten und der vierten Aminosäure. Im Gegensatz hierzu besteht die γ -Schleife nur aus drei Aminosäuren mit Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidbindungen der ersten und dritten Aminosäure [15, 17].

Größere Schleifenstrukturen finden sich in der Literatur wieder. Die Ω -Schleife bildet hierbei eine der am besten beschriebenen Schleifen, die eine Richtungsänderung der Aminosäurekette bewirkt. Im Durchschnitt besitzt sie acht Aminosäuren für den Fall, dass die Aminosäureseitenketten außerhalb der Schleife und zehn für eine Lage innerhalb der Schleife. Somit bestehen diese Schleifen aus mehr Aminosäuren und daher können die Enden der Schleife sich bis auf eine kürzere Distanz annähern. Sie bilden auf diese Weise den Buchstaben „ Ω “ [18, 19].

Es werden auch weitere Arten von Schleifen gelegentlich beschrieben und sogar in seltenen Fällen bestätigt, diese spielen aber bei der Charakterisierung von Proteinstrukturen selten eine entscheidende Rolle [17].

Tertiärstrukturen, die die Gesamtheit der räumlichen Struktur einer Proteinkette bilden, können zusätzlich zu den Sekundärstrukturen weitere verbreitete Strukturmerkmale besitzen, wie zum Beispiel das EF-Handmotiv, das durch die Abfolge von Helix-Schleife-Helix gekennzeichnet ist oder das DNS-Bindungsmotiv „Zinkfinger“ [8]. Man findet in Proteinen bestimmte Verteilungsregeln für Aminosäurereste. So liegen bei globulären Proteinen polare Aminosäuren auf der Oberfläche des Proteins, während man hydrophobe Reste enggepackt im Proteininneren findet. Die ungeladenen, polaren Aminosäuren Ser, Thr, Asn, Gln kommen nicht nur auf der Oberfläche vor, man findet sie auch teilweise im Innern des Proteins, wo sie Wasserstoffbrückenbindungen mit anderen polaren Strukturen, z.B. andere polare Aminosäureseitenketten oder Peptidbindungen, ausbilden [8, 9]. In Transmembranproteinen befinden sich hydrophobe Aminosäuren auf der von ihnen zu der Zellmembran gewandten Proteinoberfläche, damit sie sich auf diese Weise in die hydrophobe Membran einlagern können [8].

Proteine, die mehr als 200 Aminosäuren besitzen, sind oft in globuläre Teilbereiche aufgeteilt, die von anderen Strukturmerkmalen getrennt sind. Diese Teilbereiche werden als Domänen bezeichnet und umfassen durchschnittlich 100 bis 200 Aminosäurereste [9].

Nicht jedes Protein erfüllt die Voraussetzungen für eine Quartärstruktur, da es hierfür aus mehr als einer Peptidkette bestehen muss. Aber gerade bei Proteinen mit einer Größe von mehr als 100 kDa liegen mehrere Aminosäureketten vor. Die Synthese von kleineren Fragmenten bietet mehrere Vorteile, da so eine Reparatur von defekten Bereichen von den Zellen leichter durchzuführen ist, die Herstellung an unterschiedlichen Orten in der Zelle möglich ist und auch die Selbstassoziation durch kürzere Ketten erleichtert ist. Auch die Effektivität von Enzymen durch identische Untereinheiten ist erhöht, da diese jeweils ein eigenes aktives Zentrum zum Gesamtprotein beitragen können [9]. Die einzelnen Untereinheiten sind meist nicht durch kovalente Bindungen miteinander verbunden, sondern sie sind durch Van-der-Waals-Kräfte assoziiert. Das Gesamtprotein weist meist eine Rotationssymmetrie auf [8–11].

2.1.3. Antikörper

Antikörper oder auch Immunglobuline (Ig) sind Proteine, welche die humorale Antwort des Immunsystems auf exogene bzw. unbekannte Strukturen, wie z.B. Oberflächenproteine von Bakterien und Viren, aber auch pathologisch bedingt auf körpereigene Proteine, bilden [8–11, 20]. Aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit und Spezifität für bestimmte Strukturen werden sie auch gentechnisch hergestellt und bei Autoimmunerkrankungen, wie Psoriasis, Allergien und psoriatischer Arthritis sowie Tumorerkrankungen eingesetzt [21, 22]. Häufig werden, aufgrund der sehr spezifischen Erkennung von Oberflächenstrukturen (Epitope), Antikörperkonjugate verwendet, um gezielt Arzneistoffe oder Radionuklide in die räumliche Nähe ihres Ziels zu bringen [21–23].

Allgemein gilt der IgG-Antikörper als Prototyp der typischen Immunglobulinstruktur, da er der häufigste Antikörper-Typ im Plasma ist. Ihm liegt eine „Y-ähnliche“ Struktur zugrunde, die aus einem achsensymmetrischen Heterotetramer aufgebaut ist. Dieses Tetramer besteht aus zwei langen Aminosäureketten, den schweren Ketten (je ca. 50 kDa), und zwei kurzen Aminosäureketten, den leichten Ketten (je ca. 25 kDa), welche über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Die einzelnen Ketten besitzen globuläre Bereiche, die charakteristisch für Antikörper sind, die sogenannten Immunglobulindomänen. Hierbei handelt es sich um β -Fass-Strukturen bestehend aus vier und fünf bzw. vier und drei antiparallel verlaufende β -Faltblätter [24].

Die Arme des „Y“ enthalten an den N-Termini die Antigenbindungsstellen und werden auch als Fab-Fragmente bezeichnet. Da zwei Fab-Fragmente vorhanden sind, kann ein Antikörper zwei Antigene binden. Neben dem antigenbindenden Fab-Fragment enthalten Antikörper am C-Terminus einen Effektoranteil, das Fc-Fragment. Das Fc-Fragment dient der Interaktion mit Effektorzellen und Effektormolekülen [20, 24].

Man kann das Fab-Fragment in weitere Untereinheiten einteilen. Man unterscheidet die konstanten Regionen der schweren Kette (C_H1) und der leichten Kette (C_L) von den variablen Regionen der leichten (V_L) und der schweren Kette (V_H). Die konstanten Regionen C_L und C_H1 sind miteinander mittels Disulfidbrücken verbunden. Die Gelenkregion Hinge verbindet das Fab- und das Fc-Fragment miteinander und hält die beiden Antikörperhälften mittels Disulfidbrücken zusammen (**Abbildung 2**). Um eine Unzahl von verschiedenen Antigenen binden zu können, muss die Struktur der Antikörper in bestimmten Regionen eine sehr hohe Variabilität aufweisen. Diese Regionen befinden sich am N-Terminus des Antikörpers im Fab-Fragment. Hier bilden sie die sogenannten komplementaritätsbestimmenden Regionen („complementary determining regions“ oder kurz CDRs) aus, die aus hypervariablen Schleifen bestehen und die Antigenbindungsstellen bilden. Jeder Arm eines Antikörpers besitzt sechs solcher hypervariablen Schleifen, jeweils drei befinden sich in der V_L - und H_L -Domäne. Von den sechs Schleifen besitzen fünf nur eine begrenzte Anzahl an Konformationen. Sie werden durch die Länge der Schleife und die Anwesenheit bestimmter Aminosäuren an spezifischen Positionen in der Schleife gebildet. Die sechste Schleife (CDR-H3) befindet sich auf der schweren Kette und besteht in der Regel aus zehn Aminosäureresten, die eine besonders hohe Variabilität in ihrer Sequenz aufweist [25].

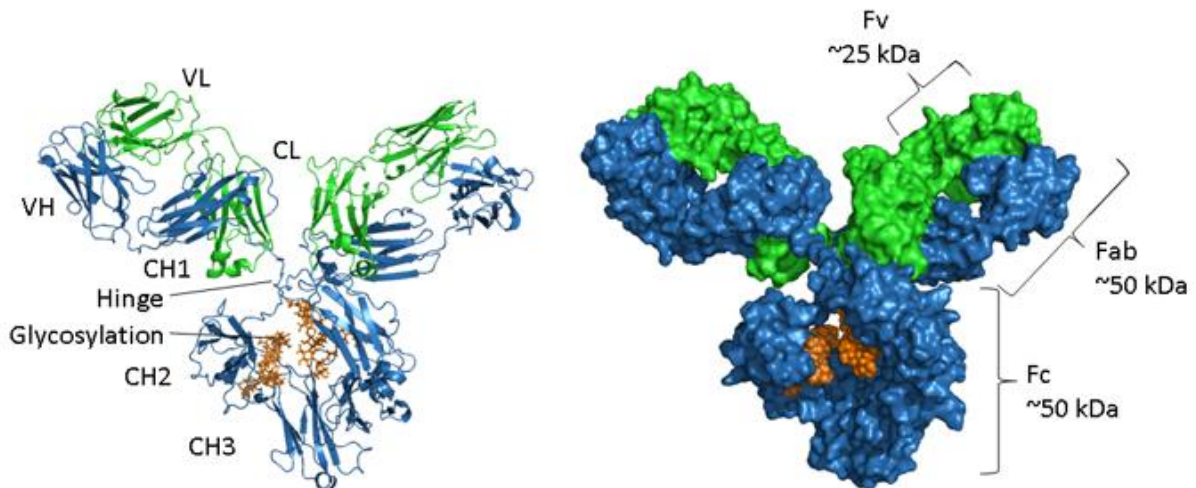


Abbildung 2 Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers mit variablen leichter und schwerer Kette (V_L bzw. V_H), konstanter leichter und schweren Kette (C_L bzw. C_H1 , C_H2 und C_H3), „Hinge“-Region und Glykosylierung (linke Abbildung). Sowie Darstellung der Fv-, Fab- und Fc-Fragmente mit Molekularmassenangaben (rechte Abbildung) [26].

In **Abbildung 2** ist die schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers gezeigt. Neben IgG gibt es weitere Antikörperklassen, die wichtigsten sind IgG, IgM, IgD, IgA und IgE. Sie unterscheiden sich durch strukturelle Eigenschaften der konstanten Regionen der schweren Kette, der An- bzw. Abwesenheit von Gelenkregionen sowie der Anzahl und der Lage von Disulfidbrücken. IgA-Antikörper liegen zusätzlich meist als Dimer vor, während IgM-Antikörper aus fünf bis sechs monomeren Antikörpern bestehen, die mit einer J-Kette zu einem Penta- bzw. Hexamer verbunden wurden [20].

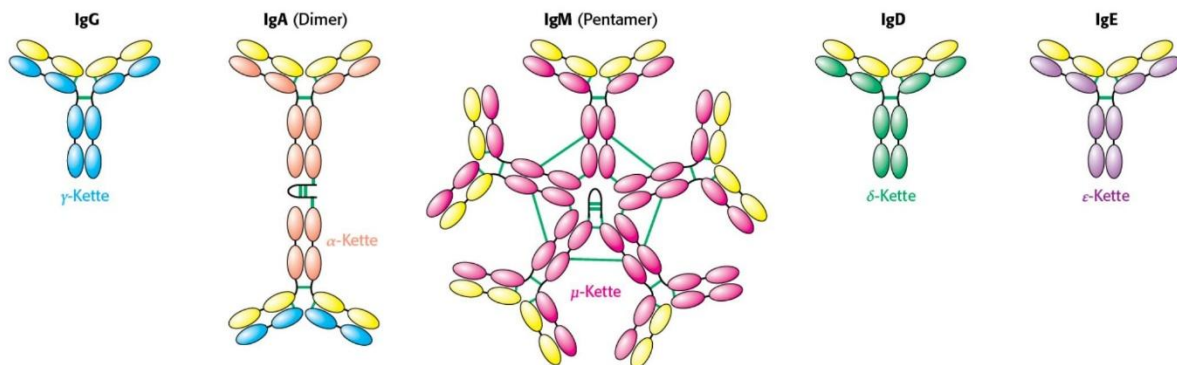


Abbildung 3 Übersicht über Antikörperklassen nach Berg *et al.* Alle 5 Klassen besitzen die gleiche leichte Kette (gelb), aber unterschiedliche schwere Ketten (γ , α , μ , δ oder ϵ) [8].

Neben diesen Merkmalen besitzen Antikörper spezielle Regionen, an denen sie glykosyliert werden (**Abbildung 2**). Das Glykosylierungsmuster ist hierbei speziesspezifisch [10, 11].

2.2. Agglomeration, Aggregation, Fragmentierung und destabilisierende Faktoren von Antikörper

Instabilitäten in den funktionsfähigen Antikörpern sind häufig auftretende Probleme vieler Zubereitungen, da sie in Abhängigkeit ihrer umgebenden Lösung, chemischen und physikalischen Veränderungen unterliegen. Diese Veränderungen können reversibel sein, wie z. B. Agglomerationen, sie können aber auch irreversibel sein, wie unlösliche Aggregate und chemische Modifikationen. Zu den chemischen

Modifikationen zählen die Bildung bzw. der Austausch von Disulfidbrücken, nicht reduzierbare Vernetzungen, Desamidierung, Isomerisierung, N-terminale Pyroglutamatbildung, Oxidation, C-terminale Abspaltung von *L*-Lysin, Bildung von Maillard-Reaktionsprodukten und Fragmentierung [22, 27]. Diese Vorgänge spielen gerade bei antikörperhaltigen Zubereitungen eine große Rolle, da hier hohe Konzentrationen an Wirkstoff verwendet werden und dadurch Agglomeration und Aggregation begünstigt sind [27, 28].

Häufig werden die Begriffe Agglomeration und Aggregation synonym verwendet oder haben wie Nichols *et al.* zeigen widersprüchliche Definitionen, weshalb die Umschreibung der beiden Begriffe nötig ist [29]. Da das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur.) die Begriffe nur indirekt beschreibt, wird auf die Definition nach ISO 14887 zurückgegriffen. Die Norm definiert Agglomerate als lockerer Zusammenschluss von Teilchen, die einfach wieder dispergiert werden können. Aggregate hingegen sind Ansammlungen von Teilchen, die durch Fusion kleinerer Teilchen, sintern oder durch Teilchenwachstum entstanden sind und nicht wieder dispergiert werden können [29, 30].

Ursächlich entstehen Agglomerate und Aggregate aufgrund desgleichen Mechanismus. Beide Vorgänge beruhen auf einer teilweisen Entfaltung der Tertiär- bzw. Quartärstruktur, so dass hydrophobe Bereiche an der Proteinoberfläche exponiert vorliegen. Diese Bereiche können nun miteinander oder mit Oberflächen interagieren und sich zu Agglomerate oder Aggregate zusammenlagern [27]. Auslösende Faktoren können hierfür unphysiologisch hohe Temperaturen, Agitation und damit verbundene Scherkräfte, extreme pH-Werte, hydrophobe Oberflächen und hohe Antikörperkonzentrationen sein [22, 27].

Fragmentierung ist ein Vorgang, der ubiquitär in allen Proteinen vorkommt und durch bestimmte Abfolgen von Aminosäuren begünstigt wird. Weitere Faktoren, welche die Fragmentierungen begünstigen, sind der pH-Wert, hohe Temperaturen, die Flexibilität im Umfeld der Fragmentierungsstelle, Frier-Tau-Zyklen und die Gegenwart von Metallionen oder Radikalen [22, 31, 32].

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Antikörperstabilität ist ein sehr gut untersuchter Prozess und lässt sich über den gesamten pH-Bereich von 0 bis 14 abbilden. Da bei niedrigen pH-Werten eine säurekatalysierte Hydrolyse der Peptidbindung und bei hohen pH-Werten eine basenkatalysierte Hydrolyse stattfindet, ist das Peptidrückgrat bei Werten um pH 7 am stabilsten [22, 31]. Auch hat die räumliche Nähe von nukleophilen Gruppen, wie z.B. die Carboxylat-Gruppe eines *L*-Aspartylrests (**Abbildung 4**) oder die Hydroxylfunktion eines *L*-Serylrests, einen Einfluss auf eine mögliche Fragmentbildung. Dies sind auch nicht die einzigen Angriffspunkte. Das Peptid kann genauso das Ziel von Nukleophilen, wie Hydroxid-Ionen sein, wie z. B. die β -Elimination am α -Kohlenstoff von *L*-Serylresten (**Abbildung 5**) oder auch an zwei Cysteinen bei gleichzeitiger Spaltung ihrer Disulfidbrücke und anschließender weiterer Degradation (**Abbildung 6**). Neben den hier explizit aufgeführten Aminosäuren befinden sich weitere spezifische Spaltungsstellen an folgenden Aminosäureresten innerhalb von Antikörpern: *L*-Glycin, *L*-Threonin und *L*-Asparagin [22, 31].

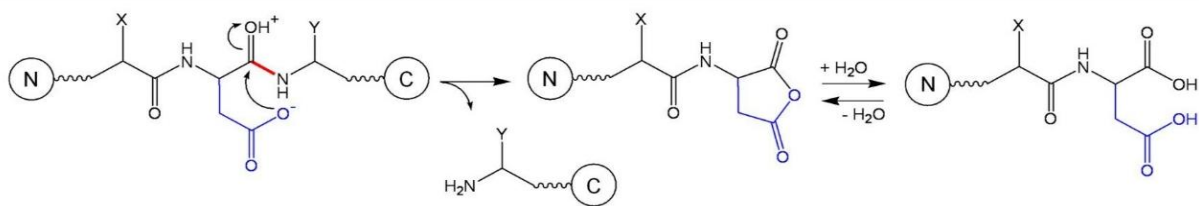


Abbildung 4 Mechanismus der Fragmentierung mittels *L*-Aspartatrest nach Vlasak und Ionescu [31].

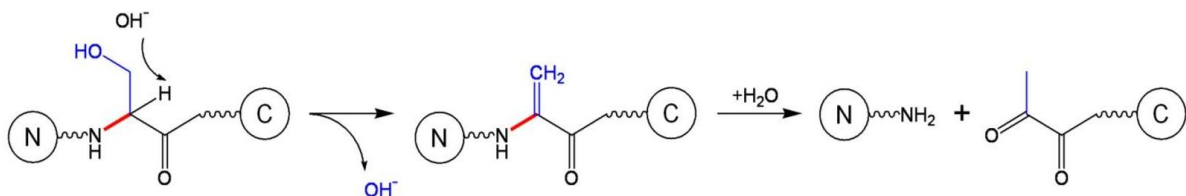


Abbildung 5 Mechanismus der Fragmentierung am *L*-Serinrest mittels β -Elimination nach Vlasak und Ionescu [31].

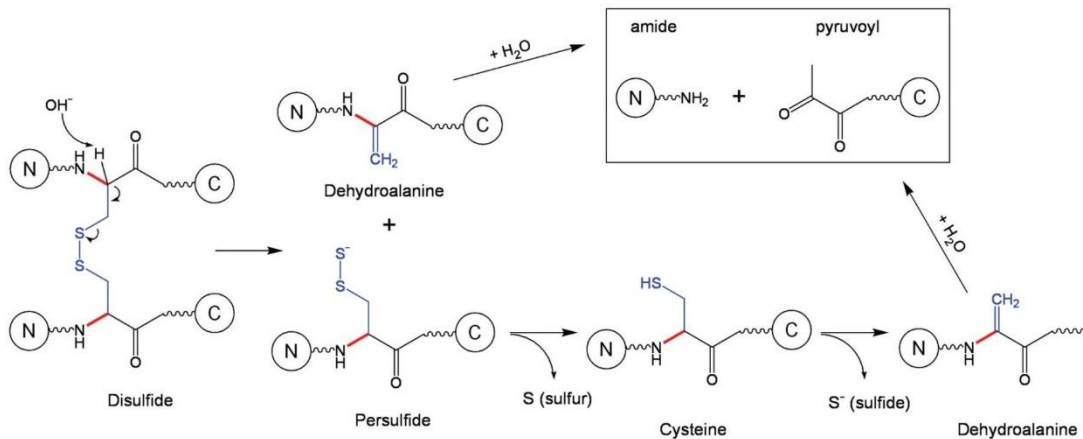


Abbildung 6 Mechanismus der Disulfidspaltung mittels β -Elimination nach Vlasak und Ionescu [31].

Es wird auch von Vlasak und Ionescu beschrieben, dass diese Fragmentierungen eher selten in starren Bereichen der Antikörper vorkommen, sondern flexiblen Schleifen, die stärker dem Lösungsmittel ausgesetzt sind [31].

Die Fragmentierung von Antikörpern durch Metallionen ist schon lange bekannt und wurde das erste Mal in Gegenwart von Cu^{2+} -Ionen berichtet [31]. Für diese Ionen wurde auch eine spezifische Schnittstelle in der Hinge-Region der Antikörper beschrieben. Bei anderen Metallionen tritt diese Fragmentierung unter den gleichen Konditionen unspezifisch auf. Die Hydrolyse durch Cu^{2+} ist pH-abhängig, die Fragmentierungsrate nimmt mit dem pH-Wert zu. Die Spaltung der Kette findet hierbei innerhalb des Motivs $\text{S}_{219}\text{CDK}_{222}\text{T}_{223}\text{HTC}$ zwischen K_{222} und T_{223} statt. Wahrscheinlich wird sie durch den Histidin-Rest in direkter Nachbarschaft unterstützt. Auch Radikalbildner wie H_2O_2 zeigen eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Fragmentierungsrate, besonders in Gegenwart von Fe^{2+} und Cu^{2+} . Hier wird eine Fenton-ähnliche Reaktion postuliert [31].

2.2.1. Stabilisatoren

Um kommerziell nutzbar zu sein, macht die Anwendung von Antikörpern als Wirkstoff in unterschiedlichen Formulierungen in der Pharmakotherapie eine Haltbarkeit der Arzneimittel von mehr als 12 Monaten notwendig. Dies ist ein großes Problem, da Instabilitäten nicht nur während der Lagerung, sondern auch während der Herstellung und dem Transport auftreten können [33].

Daher sollte bei der Entwicklung einer Formulierung bereits mit Bedacht die verwendeten Hilfsstoffe, die pH-Werte, die Puffersubstanzen und ihre Konzentrationen gewählt werden.

Die Formulierungsentwicklung beginnt meist mit dem Festlegen eines pH-Wertes, da dieser neben dem bereits beschriebenen Effekt auf die chemische Stabilität auch die Gesamtladung und die Ladungsverteilung auf der Antikörperoberfläche beeinflussen kann. Es wurde berichtet, dass ein zu saurer pH-Wert (pH 3) bei zwei monoklonalen Maus-Antikörpern zu einer Entfaltung der Tertiärstruktur und zur Präzipitation geführt hatte [22]. Aufgrund dieser Entfaltung und den pH-abhängigen Degradationswegen bzw. der pH-abhängigen Degradationsgeschwindigkeit, Oxidationen sowie deren Aminosäuresequenzabhängigkeit, ist die Wahl eines geeigneten pH-Wertes die Grundlage für eine gute Stabilisierung einer Formulierung [22, 34].

Aber nicht nur die Wahl des richtigen pH-Wertes zeigt Unterschiede in der chemischen Stabilität auf. Auch Puffersubstanzen können die Hydrolyse von Aminosäureresten beschleunigen. Phosphatpuffer zeigen im Vergleich zu Tartrat-, Citrat- und Succinatpuffer eine zweifach höhere Deamidierungsgeschwindigkeit von L-Asparagin- und L-Glutaminreste und eine erhöhte Aggregatbildungsrate [22, 35].

Eine Vielzahl weiterer Hilfsstoffe wird zur Stabilisierung eingesetzt. Diese können teilweise über mehrere Bindungsmechanismen gleichzeitig den Antikörper stabilisieren (**Tabelle 2**).

Tabelle 2 Übersicht über unterschiedliche Gruppen von Stabilisierungsmechanismen und Klassen chemischer Verbindungen bzw. einzelne Verbindungen. Die Verbindungen können mehrere, unterschiedliche Mechanismen besitzen [36].

	Bindungsmechanismus	Verbindungsklassen
1	Elektrostatische Wechselwirkungen	Hofmeister Salze Polyanionen
2	Kationen- π -Elektronen-Wechselwirkungen	Arginin
3	Präferenzielle Hydratation und präferenzielle Interaktionen	Arginin „Osmolyte“
4	Dispersive und aromatische Interaktionen	Harnstoff Arginin Kohlenhydrate
5	Interaktionen durch Wasserstoffbrückenbindungen	Kohlenhydrate TMAO Arginin

Elektrostatische Anziehungskräfte zwischen Proteinen und geladene Spezies, wie verschiedene Puffersubstanzen, Hofmeister-Anionen, negativ geladene Polysaccharide und Polyanionen, Polymere, Polyelektrolyte, geladene Tenside und Nukleotide, können sowohl stabilisierende als auch destabilisierende Wirkungen entfalten [36].

Ein gutes Beispiel hierfür ist die Hofmeister-Reihe. Sie klassifiziert anorganische Anionen nach ihrer Fähigkeit, Proteine entweder auszufällen oder die Löslichkeit zu verbessern. Der Mechanismus dieser Salze ist noch nicht gänzlich geklärt. Ging man anfänglich von einem Einfluss auf die Wasserstruktur aus, wird mittlerweile angenommen, dass sie lokal und direkt mit Proteinen interagieren somit die erste

Hydratationshülle verändern [36]. Dies konnte Gokarn *et al.* für Anionen zeigen. Sie interagieren direkt mit Proteinen, und vor allem große, monovalente Spezies können eine Kristallisation von Proteinen bewirken [37].

Die Stabilisierung mit Polyanionen ist für Antikörperzubereitungen eher untypisch. Kammerzell *et al.* benennen zwar eine Vielzahl von Proteinen, die durch lange oder kurze Polyanionen stabilisiert wurden, aber in dieser Liste ist kein Antikörper zu finden [36]. Es findet sich lediglich die Anwendung zur kontrollierten Freisetzung von monoklonalen Antikörpern aus einem Hydrogel in der Literatur. Die Langzeitstabilität dieser Zubereitung und der Einfluss des Polyanions werden hierbei nicht näher beschrieben, einzig die Angabe, dass ein Anteil von mehr als 95 % monomerer Antikörper nach 10 Tagen noch nachzuweisen war [38].

Den auf Kationen- π -Elektronen-Wechselwirkungen beruhenden Interaktionen liegen elektrostatische Anziehungskräfte zwischen der positiven Ladung der Kationen und dem Quadrupolmoment von aromatischen Aminosäuren zugrunde. Die Anziehungskräfte liegen hierbei zwischen der Mitte des planaren Ringes und dem Kation. Die beschriebenen Wechselwirkungen können nicht nur zwischen anorganischen Kationen und aromatischen Aminosäuren vorliegen, sondern auch zwischen protonierten, basischen Aminosäureresten und aromatischen Aminosäuren. Aus diesem Grund eignen sich basische Aminosäuren, vor allem Arginin, um die Löslichkeit und Stabilität von Proteinen in flüssigen Zubereitungen zu verbessern. Des Weiteren wird auch die Viskosität von hochkonzentrierten Proteinlösungen reduziert [36].

Der Vorgang der präferenziellen Hydratation bzw. präferenzielle Interaktion wird durch sogenannte Cosolventien hervorgerufen und kann mit Hilfe unterschiedlicher Modelle erklärt werden. Allen Modellen ist die Beschreibung der präferenziellen Wechselwirkungen zwischen Cosolvent und Antikörper bzw. präferenzielle Hydratation des Antikörpers gemeinsam, die beeinflusst werden durch osmotischen Stress und thermodynamische Vorgänge [36].

Die präferenzielle Hydratation liegt vor, wenn das Binden eines Liganden sich auf die thermodynamischen Eigenschaften auswirkt, d.h. wenn die freie Enthalpie zunimmt [36]. Ein gut untersuchtes Beispiel ist auch hier Arginin. Trout *et al.* berichten, dass das Vorliegen einer präferenziellen Interaktion oder Hydratation abhängig von der Arginkonzentration und der Proteinoberfläche ist. Bei niedrigen Konzentrationen wird eine präferenzielle Interaktion und bei hohen eine Hydratation beschrieben [36, 39].

Weitere Beispiele sind die sogenannten „Osmolyte“, wie z.B. Trimethylaminoxid (TMAO), Harnstoff und Glycerol. Während TMAO und Glycerol indirekt mit dem Proteinrückgrat interagieren (präferenzielle Hydratation), findet bei Harnstoff eine direkte Interaktion statt (präferenzielle Interaktion). In der Literatur wird für Osmolyte angenommen, dass eine indirekte Interaktion meist zu einer stabilisierenden, während direkte Interaktionen zu einer destabilisierenden Wirkung führen [36, 40].

Wie schon aus **Tabelle 2** ersichtlich ist, weisen die meisten Stoffe mehr als nur einen Interaktionsmodus auf. Dies gilt neben Arginin vor allem für Harnstoff. Diese beiden besitzen, neben den bereits erwähnten Eigenschaften, auch noch die Fähigkeit dispersive und aromatische Interaktionen einzugehen. Obwohl disperse Kräfte allgegenwärtig sind, sind sie die am schwersten zu charakterisierenden. Denn sie beruhen hauptsächlich auf Fluktuationen der Ladungsverteilung von ungeladenen Spezies. Hierbei richtet sich die Ladungsverteilung an einem Interaktionspartner so aus, dass das entstehende Dipolmoment entgegengesetzt zu dem des Bindungspartners ist. Die disperse Kraft bildet, bei der

Abwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungen und geladenen Spezies, die dominierende Kraft für Wechselwirkungen zwischen zwei Bindungspartnern [36].

Mit Hilfe dieses Ansatzes lässt sich die proteinentfaltende Wirkung von Harnstoff sehr gut beschreiben. Harnstoff schwächt die Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Bereichen in Proteinen und die Wasserstoffbrückenbindungen an Peptidbindungen durch präferenzielle Interaktion. Zusätzlich kann es, durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den umgebenden Wassermolekülen, als Lösungsvermittler für hydrophobe Bereiche wirken [41, 42].

Das beste Beispiel für aromatische Interaktionen bilden Kohlenhydrate, da sie mit den π -Elektronen von aromatischen Aminosäuren sowohl über OH- π -Elektronen- als auch CH- π -Elektronen-Interaktionen wechselwirken. Diese Wechselwirkungen können, vor allem in der festen Phase, durch Zuckerkristallisation und den beschriebenen Wechselwirkungen zwischen diesen Stoffen, zur Aggregation von Proteinen führen [36].

Interaktion über Wasserstoffbrückenbindungen ist eine weitere Art der Stabilisierung, die sehr weit verbreitet ist. Die Stärke dieser Bindung liegt zwischen der von dispersiven und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Wasserstoffbrückenbindungen von Proteinen können von vielen verschiedenen Hilfsstoffen, wie Kohlenhydrate, Polyole, Osmolyte, polare Lösungsmittel, Ionen, Aminosäuren und Polymeren verändert werden. Diese Stoffe sind in der Lage, direkt mit dem Protein, mit dem Lösungsmittel oder mit beiden gleichzeitig diese Bindung einzugehen [36]. Die wichtigsten Beispiele hierfür bilden Kohlenhydrate. Sie dienen dem Schutz vor dehydratations- und einfrierbedingtem Denaturieren von Proteinen. Dieser Effekt kommt durch einen Austausch der Wasser-Protein-Wasserstoffbrückenbindungen durch Kohlenhydrat-Protein-Wasserstoffbrückenbindungen zustande [36, 43].

2.2.3. Methoden zur Antikörperstabilitätsuntersuchung

Die „International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use“-Guidelines (ICH-Guidelines) beschreiben in ihrer Qualitätsrichtlinie für die Stabilitätstestung von Biotechnologika bzw. biologischen Arzneimitteln (Q5C), dass die absolute Reinheit für diese Produkte sehr schwer zu bestimmen ist. Dies liegt an den beschriebenen Instabilitäten, wie Deamidierung, Oxidation, Aggregation bzw. Agglomeration und weitere chemische Veränderungen sowie einen unterschiedlichen Grad an Glykosylierungen und Ladungsheterogenitäten von Antikörpern. Aufgrund dieser vielen unterschiedlichen Instabilitäten empfiehlt die ICH, mehrere geeignete Methoden zu verwenden, um die Zubereitungen zu charakterisieren und Instabilitäten zu überwachen [44]. Für die Charakterisierung und Überwachung steht eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung, die meist komplementär eingesetzt werden.

Zu diesen Techniken gehören die Umkehrphasenflüssigkeitschromatographie (RPLC), hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC), hydrophile Interaktionsflüssigkeitschromatographie (HILIC), die Größenausschlusschromatographie (SEC), die Ionenaustauschchromatographie (IEX), die Natriumdodecylsulfat-Acrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), die kapillarisoelektrische Fokussierung (CIEF), die Kapillargelelektrophorese (CGE), die Kapillarzonenelektrophorese (CZE), der Zirkulardichroismus (CD), die Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie (FT-IR), die Fluoreszenzspektrophotometrie (FL) und die Massenspektrometrie (MS) [45, 46].

Die aufgeführten Techniken werden verwendet, um unterschiedliche Eigenschaften von proteinhaltigen Lösungen zu untersuchen. Während SEC, SDS-PAGE und CGE Aussagen zu der Größe, des in der

Lösung enthaltenen Antikörpers und dessen Fragmente bzw. Modifikationen gibt, können FT-IR, FL, CD und MS genauere Hinweis auf die vorliegende Struktur geben und können daher als „higher order structure“-Techniken zusammengefasst werden [5, 47–49].

Ladungsheterogenitäten können mit Hilfe von IEX und CIEF erkannt werden. RPLC und CZE können in der Antikörperanalyse mehrere Rollen übernehmen, da sie nicht nur als eigenständige Technik zur Erkennung von Verunreinigungen und Abbauprodukten verwendet werden, sondern auch gekoppelt mit anderen Techniken zur vorherigen Trennung der unterschiedlichen Stoffe in der Probe, z. B. bei MS-Analysen [45].

Bei der SEC handelt es sich um eine nicht-denaturierende chromatographische Technik, die Moleküle nach ihrer Größe auftrennt. Die Technik eignet sich, um die Größenverteilung innerhalb einer Antikörperlösung zu untersuchen und gibt dabei Auskunft über die Anwesenheit von enzymatischen und nicht-enzymatischen Abbauprodukten und den nicht ordnungsgemäßen Einbau der Ketten in ein Antikörpermolekül durch falsch verbundene Disulfidbrücken. Auch können Dimere, Oligomere und Aggregate des Antikörpers voneinander getrennt werden und somit Heterogenitäten in der Lösung beschrieben werden. Es können, bei sehr kleinen Probenmengen oder wenn eine besonders sensitive Detektion von Aggregaten notwendig ist, anstatt den herkömmlichen Säulen, kurze, kapillare SEC-Säulen verwendet werden [45, 46].

Die Verwendung von CGE-Methoden zur Analyse von antikörperhaltigen Lösungen bietet gegenüber SEC-Methoden weitere Anwendungsmöglichkeiten. Im Vergleich zu der verwandten SDS-PAGE-Technik bietet die CGE die Möglichkeit einer Automatisierung der Messmethode und durch weniger manueller Arbeitsschritte eine höhere Reproduzierbarkeit sowie eine bessere Quantifizierung ohne den Umgang mit umweltgefährdenden Substanzen, wie z.B. bei der Silberfärbung [46, 50].

Die RPLC wird häufig im Bereich der Stabilitätsuntersuchung von Antikörperlösungen, aufgrund ihrer überlegenen Robustheit, der hohen Auflösung und ihrer uneingeschränkten Kompatibilität mit MS-Geräten verwendet. Trotz der harschen Bedingungen (Temperaturen zwischen 60 und 90°C und organische Lösungsmittel in der mobilen Phase wie z.B. Acetonitril, Isopropanol oder Methanol sowie Anteile von Trifluoressigsäure und Ameisensäure) ist sie eine der Standardtechniken in der Routineanalytik. Das Einsatzgebiet der RPLC in der Analytik von Antikörpern bezieht sich in der Regel auf die Bestimmung der Identität, Stabilität, Haltbarkeits- sowie Freigabeuntersuchungen. Hierbei kann die Technik durch chemische Veränderungen entstandene Stoffe, wie Oxidations-, Reduktions-, Deamidierungs- sowie weitere Produkte auftrennen. Um eine Auftrennung zu erreichen, müssen sich diese Stoffe in ihrer Hydrophobizität vom nativen Antikörper unterscheiden. Eine weitere Erhöhung der Trennleistung kann auch mit Hilfe einer Kopplung der RPLC mit anderen Techniken, wie z.B. HILIC, HIC und MS oder anderen RPLC-Säulen erreicht werden [46].

Die HIC ist eine Technik, die vor allem in der Analytik von Antikörper-Arzneimittel-konjuganten (ADC) eingesetzt wird. Mit ihrer Hilfe lassen sich die unterschiedlich stark beladenen Antikörper voneinander trennen und somit die Verteilung der unterschiedlichen ADC bestimmen [46].

Ladungsunterschiede innerhalb einer Antikörperlösung können mit IEX und CIEF untersucht werden. Im Falle der IEX ist der Modus des Kationenaustauschs und Elution mittels Salzkonzentrationsgradienten die am häufigsten eingesetzte Methode. Seltener werden Anionenaustauscher eingesetzt, da hierfür der isoelektrische Punkt des Antikörpers unter pH 7 liegen muss. Auch der Einsatz von pH-Gradienten ist eher untypisch. IEX erlaubt die Untersuchung von Heterogenitäten, die auf Modifikationen, wie

Pyroglutamatbildung, Deamidierung, C-terminaler Verlust von *L*-Lysylresten, Sialylierung und weiteren chemischen Modifikationen, die die Gesamtladung beeinflussen, beruhen [46].

Ladungsheterogenitäten hervorrufende Modifikationen können auch mittels CIEF untersucht werden. Der Nachteil der CIEF einer erhöhten Analysenzeit, die durch die Mobilisierung der Zonen verursacht wird, kann bei der sogenannten „imaged CIEF“ (iCIEF) ausgeglichen werden. Bei dieser Abwandlung der CIEF werden kürzere (teilweise nur 5 cm lange), transparente Kapillaren verwendet und mit Hilfe bildgebender Verfahren alle Zonen gleichzeitig erfasst [51, 52].

Aufgrund der zugrundeliegenden Trenntechnik eignet sich CZE besonders zur Untersuchung von proteinhaltigen Lösungen auf Ladungsheterogenitäten und Verunreinigungen. Der Mechanismus der Auftrennung nach Größe-Ladungs-Verhältnis kommt, aufgrund der geringen Masseunterschiede, für Antikörper nicht zum Tragen. Es findet daher eine primär ladungsbasierte Trennung statt, mit der post-translationale Modifikationen und chemischen Modifikationen vom unveränderten Antikörper getrennt werden können. Im Gegensatz zu der RPLC werden weitere Nebenprodukte erfasst, die entweder im Totvolumen eluieren oder an der stationären Phase adsorbieren [45, 46].

3. Bioanorganische Komplexe und Protein-Metallionen-Interaktionen

Metalle bzw. Metallionen sind in unserer Umwelt allgegenwärtig und haben einen Einfluss auf den Stoffwechsel aller Lebewesen. Daher wenden sich verschiedene Forschungsfelder dem Einfluss von Metallionen zu. Metallomics ist einer dieser Bereiche und beschäftigt sich mit der Rolle von Spurenelementen, ihrer Aufnahme und Speicherung [53].

Ein kleineres Feld deckt Metalloproteomics ab. Es behandelt Proteine, die ein oder mehrere Metallionenzentren aufweisen [53–55]. Metalloproteomics befasst sich mit der Funktion von Metalloproteinen und der Wirkung der Metallionen. Die Interaktionen der Metallzentren mit Substraten, Kofaktoren oder strukturgebenden Komponenten, wie Aminosäureresten, können durch Komplexierung der Metallionen mit Biomolekülen, wie z. B. Proteinen und Desoxyribonukleinsäure (DNS) beschrieben werden. Sie lässt sich mit Hilfe der Komplexchemie darstellen, vorhersagen und den Reaktionsmechanismus für Metalloenzyme erklären.

3.1. Physiologische und pathologische Aspekte

Metallionen erfüllen in Organismen vielfältige Aufgaben und sind, direkt oder indirekt, an vielen Funktionen verschiedener Gewebe beteiligt. Sie kommen in unterschiedlichen Konzentrationen intra- sowie extrazellulär vor und ihre Verteilung wird unter normalen Bedingungen streng reguliert. Auch werden sie je nach Gesamtkonzentration im Organismus den Mineralstoffen oder Spurenelementen zu geordnet.

Minderversorgung mit einem oder mehreren dieser Ionen kann die Funktion von Organen, wie z.B. die Nieren, die Leber aber auch ganze Systeme wie das Immun- und das Nervensystem negativ beeinflussen. Auch zu hohe Konzentrationen können zu Intoxikationen und damit zur Schädigung unterschiedlicher Gewebe oder Organe führen [56].

Die Veränderungen aufgrund unphysiologisch hoher Konzentrationen bestimmter Metallionen lassen sich auf unterschiedliche Mechanismen zurückführen und reichen von Ersatz des nativen Metallions in Metalloproteinen über Katalyse der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bis zur Interaktion mit Biomolekülen und Beeinflussung ihrer Struktur bzw. Funktionalität [56–58].

Die Einflüsse auf die DNS können, je nach Metallion, zu einer kovalenten Bindung und damit zu einer dauerhaften Schädigung von Zellen oder sogar zum Zelltod mittels apoptotischen oder nekrotischen Signalweg führen. Diese Eigenschaft ist der Grund für die Anwendung einiger metallionenhaltiger Verbindungen in der Tumorthherapie [12, 13, 59, 60].

3.2. Relevanz von Metall-Protein-Interaktionen

Die Häufigkeit des Auftretens von Wechselwirkungen zwischen Metallionen und Proteinen ist verhältnismäßig hoch. In der Literatur finden sich Schätzungen, dass der Anteil an Metalloproteinen an bekannten Proteinen etwa ein Drittel beträgt [53, 54].

Da die Anzahl der aufgeklärten Proteinstrukturen weiter steigt, ist es nicht auszuschließen, dass sich das Verhältnis zu einem größeren Anteil verschieben kann.

Auch Ionen in der umgebenden Lösung spielen eine Rolle und können die Ladungseigenschaften von Proteinen beeinflussen [7, 61].

3.3. Grundlagen der Koordinationschemie

Die Komplexchemie, auch Koordinationschemie, beschäftigt sich mit Komplexverbindungen. Sie zeichnen sich durch ein Zentralteilchen, das von einer Ligandenhülle umgeben ist, und ihren typischen Eigenschaften und Reaktionen aus [60]. Bei dem Zentralteilchen handelt es sich um ein Atom oder Ion, während Liganden als Ionen oder Moleküle vorliegen. Komplexe können aus einem oder mehreren Zentralteilchen bestehen und werden dementsprechend als einkernige oder mehrkernige Komplexe bezeichnet. Auch können Liganden mehr als nur eine Bindung mit dem Zentralteilchen eingehen, diese Liganden werden als mehrzählige Liganden oder, wenn dadurch ein bzw. mehrere Ringe geschlossen werden, als Chelatbildner bezeichnet. Die Anzahl der Ligandenbindungsstellen wird für Komplexe über die Koordinationszahl (KZ) angegeben [60].

Bei Komplexverbindungen mit Metallion als Zentralteilchen werden in der Regel die Elektronenpaare von den Liganden zur Verfügung gestellt. Bei einigen Komplexen können einzelne Elektronen nicht eindeutig dem Zentralteilchen oder dem Ligand bzw. den Liganden zugeordnet werden, da durch Anregung mittels Absorption eines Lichtquants, Einelektronenübergänge zwischen Ligand und Metallionenzentralteilchen auftreten können. Dieser Vorgang wird als Charge-Transfer (CT) bezeichnet und die vorliegenden Komplexverbindungen als Charge-Transfer-Komplexe [60].

Bei Komplexverbindungen richten sich die räumliche Anordnung, die Anzahl der Liganden sowie die magnetischen Eigenschaften des Komplexes nach der Valenzelektronenkonfiguration der Metallionen. Sie besitzen auch weder die elektrische Leitfähigkeit der einzelnen Teilchen noch können sie Reaktionen der Einzelteilchen eingehen, sondern besitzen Eigenschaften, die für den Komplex charakteristisch sind [60, 62].

Häufige KZs für Komplexverbindungen sind 2, 4, 6 und 8. Durch sterisch anspruchsvolle Liganden können auch andere KZs erzwungen werden, wie z. B. KZ = 5 [62]. Komplexe mit der gleichen KZ können unterschiedliche Anordnungen von Liganden besitzen, wie im Fall von KZ = 4; hier können die Liganden tetraedrisch oder quadratisch-planar vorliegen (**Abbildung 7**) bzw. zwischen den beiden Geometrien in Form eines verzerrten Tetraeders liegen [60, 62]. Diese Geometrien, die KZs, bevorzugte Liganden und elektronische Effekte können mittels Ligandenfeldtheorie erklärt werden.





KZ	Räumliche Anordnung der Liganden	Beispiele
2	 linear	$[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$, $[\text{AuCl}_2]^-$, $[\text{CuCl}_2]^-$
4	 tetraedrisch	$[\text{BeF}_4]^{2-}$, $[\text{ZnCl}_4]^{2-}$, $[\text{Cd}(\text{CN})_4]^{2-}$, $[\text{CoCl}_4]^{2-}$, $[\text{FeCl}_4]^-$, $[\text{Cu}(\text{CN})_4]^{3-}$, $[\text{NiCl}_4]^{2-}$
4	 quadratisch-planar	$[\text{PtCl}_4]^{2-}$, $[\text{PdCl}_4]^{2-}$, $[\text{Ni}(\text{CN})_4]^{2-}$, $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$, $[\text{AuF}_4]^-$
6	 oktaedrisch	$[\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, $[\text{V}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$, $[\text{PtCl}_6]^{2-}$

Abbildung 7 Übersicht über ideale räumliche Anordnungen von Ligand für unterschiedliche Koordinationszahlen (KZ) mit Beispielen für anorganische Komplexe nach Riedel *et al* [60].

3.3.1. Ligandenfeldtheorie

Die Ligandenfeldtheorie beschreibt die Wechselwirkungen zwischen dem Zentralteilchen und den Liganden. Sie beruht auf den Prinzipien der Kristallfeldtheorie und erweitert sie durch die Anwendung der Molekülorbital-Theorie (MO-Theorie) auf die Problemstellung. Sie erklärt spektroskopischen Eigenschaften von Komplexen, die nicht ausschließlich durch die Kristallfeldtheorie beschrieben werden können, wie z. B. Effekte, die auf 4d- und 5d-Orbitale zurückzuführen sind [62].

Die Behandlung von Komplexen kann mittels zweier Ansätze erfolgen, der Einelektronennäherung und der Mehrelektronennäherung. Sie unterscheiden sich in der Betrachtung der Elektronen. Während die Einelektronennäherung die Kopplung der Spins von d-Elektronen untereinander nicht zulässt, findet bei der Mehrelektronennäherung eine Kopplung statt, die zwar den Komplex quantitativ genauer beschreibt aber zu keinen anschaulichen Orbitalen führt [62].

Die Kristallfeldtheorie kann zur qualitativen Erklärung von physikalischen und chemischen Eigenschaften von Übergangsmetallkomplexen, wie z.B. elektronische Spektren, Färbung, magnetische Eigenschaften, Struktur und bevorzugte Oxidationszahlen herangezogen werden [60, 62]. Sie geht von Wechselwirkungen zwischen Zentralteilchen und Liganden aus, die ausschließlich elektrostatischer Natur sind.

Es werden hierbei die Liganden als Punktladungen behandelt und zur Betrachtung der Wechselwirkungen nur die d- bzw. f-Orbitale der Metalle bzw. Metallionen berücksichtigt. Wird der Komplex einer sphärischen, ihn umgebenden Ladungsverteilung ausgesetzt, dann werden die Energien der entarteten Orbitale angehoben, wird aber das Zentralteilchen nicht kugelförmig umgeben, sondern liegen die Liganden, z. B. auf den Ecken eines Oktaeders, wird die Entartung aufgehoben und die Orbitale können klassifiziert werden als die energetisch günstigeren t_{2g} - und energetisch ungünstigeren e_g -Orbitale.

Es tritt durch die Besetzung der energetisch abgesenkten t_{2g} -Orbitale ein Energiegewinn auf. Die Energiedifferenz zu der Energie der entarteten d-Orbitale wird als Ligandenfeldstabilisierungsenergie bezeichnet. Die Aufspaltung lässt sich durch die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den d- bzw. f-Orbitalelektronen des Zentralteilchens und den Elektronen der Liganden erklären. Die Absenkung der t_{2g} - und die Erhöhung der e_g -Orbitale erfolgen nach dem Schwerpunktsatz, d.h. der Betrag der Gesamtenergie der e_g -Orbitale entspricht, der der t_{2g} -Orbitale. Eine Zuordnung der d-Orbitale zu diesen beiden Orbitalgruppen kann einfach graphisch vorgenommen werden, wie **Abbildung 8** es für ein oktaedrisches Ligandenfeld zeigt [60].

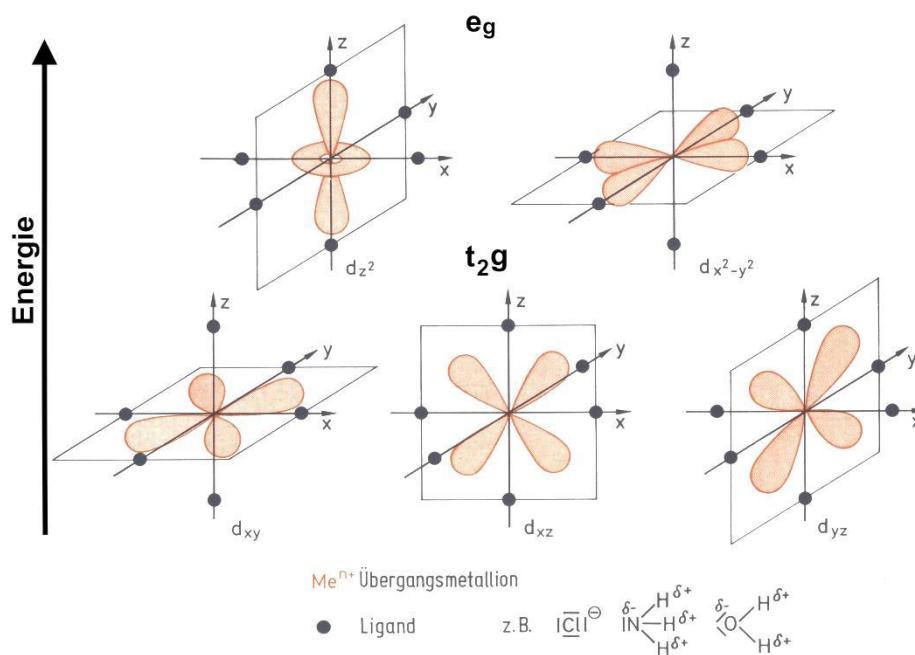


Abbildung 8 Übersicht über die Annäherung von Liganden (schwarzer Punkt) an das Metallionenzentrum (Ursprung des Koordinatensystems) für die e_g -Orbitale d_{z^2} und $d_{x^2-y^2}$ sowie die t_{2g} -Orbitale d_{xy} , d_{xz} und d_{yz} (von oben links nach unten rechts) im oktaedrischen Ligandenfeld modifiziert nach Riedel *et al* [60]. Liegen Ligand und Orbital auf derselben Achse ist die Abstoßung erhöht und somit auch die Energie des Orbitals.

Hierbei wird ein Zentralteilchen in den Ursprung eines dreidimensionalen, kartesischen Koordinatensystems gelegt und die Liganden auf dessen Achsen. Legt man nun die 5 verschiedenen d-Orbitale des Zentralteilchens in das Koordinatensystem, kann man sie je nach ihrer Lage als d_{xy} -, d_{xz} -, d_{yz} -, $d_{x^2-y^2}$ - oder d_{z^2} -Orbital bezeichnen. Es fällt auf, dass zwei der Orbitale ($d_{x^2-y^2}$ und d_{z^2}) eine räumliche Nähe zu den Liganden aufweisen. Diese liegen somit energetisch ungünstig und bilden daher die e_g -Orbitale im oktaedrischen Ligandenfeld [60, 62]. Durch das Besetzen der t_{2g} -Orbitale nach der Hundschen Regel ergibt sich für Zentralteilchen mit 1, 2, 3, 8, 9 und 10 d-Elektronen ein energieärmerer Zustand, da zunächst t_{2g} -Orbitale und anschließend die e_g -Orbitale besetzt werden.

Für Zentralteilchen mit 4, 5, 6 und 7 d-Elektronen besteht zusätzlich die Möglichkeit die Orbitale nicht nach der Hund'schen Regel zu besetzen, d. h. es werden die e_g -Orbitale einzeln von Elektronen besetzt bevor die t_{2g} -Orbitale doppelt besetzt werden. Somit ergeben sich die beiden Elektronenzustände „high spin“- und „low spin“. Als „high spin“-Zustand wird der Zustand mit der maximalen Anzahl an ungepaarten Elektronen beschrieben, während beim „low spin“-Zustand zunächst die t_{2g} -Orbitale vollbesetzt werden.

Ob ein Komplex im „high spin“- oder „low spin“-Zustand vorliegt, hängt hierbei von den Liganden ab, da die Liganden die Stärke der Aufspaltung der Orbitalgruppen bestimmen. Ist die Aufspaltung groß, so ist die Besetzung der e_g -Orbitale ungünstig. Ist jedoch die Aufspaltung gering, so ist die Besetzung der e_g -Orbitale günstiger, da die Energie, die nötig ist um den Spin zweier Elektronen in einem Orbital zu paaren (auch Spinpaarungsenergie genannt) höher ist als die Energie, die benötigt wird um eines der e_g -Orbitale zu besetzen. Die maximale Anzahl an ungepaarten Elektronen in „high spin“-Komplexen bedingt auch ein größeres, permanentes magnetisches Moment als bei vergleichbaren „low spin“-Komplexen und können somit anhand ihrer paramagnetischen Eigenschaften unterschieden werden [60, 62].

Die unterschiedlichen Elektronenkonfigurationen haben nicht nur einen Einfluss auf das magnetische Moment, auch die Geometrie der Komplexe können, wie z.B. bei d^4 -Konfiguration (Cr^{2+}) und d^7 -„low spin“-Konfiguration (Co^{2+}) beeinflusst werden.

Die Unterscheidung in d^7 -„high spin“ und „low spin“ (bzw. für Cu^{2+} in quadratisch-planar und quadratisch-bipyramidal koordiniert) ist nur durch einen Energiegewinn durch eine Verzerrung des Oktaeders in z-Richtung möglich, dies geschieht unter Aufhebung der Entartung der d_{z^2} - und $d_{x^2-y^2}$ -Orbitale. Die möglichen Änderungen können entweder durch eine Stauchung der z-Achse oder eine Streckung der Achse erreicht werden. Bei einer Streckung ist das $d_{x^2-y^2}$ -Orbital aufgrund der Orientierung entlang der x- und y-Achse und der somit verbundenen Ausrichtung auf die vier Liganden auf diesen Achsen ungünstiger als das auf nur zwei Liganden ausgerichtete d_{z^2} -Orbital. Die Energie wird hierbei durch eine Erhöhung der Entfernung zwischen den beiden Liganden und dem Zentralteilchen verringert.

Dieses Phänomen wird als Jahn-Teller-Effekt bezeichnet und führt, z. B. bei Cu^{2+} -Ionen, zu einer quadratisch-bipyramidalen Koordination von Liganden. Als Extremfall dieser Koordination kann die quadratisch-planare Koordination angesehen werden, hier liegt das Energieniveau des d_{z^2} -Orbitals unterhalb des Niveaus des d_{xy} -Orbitals oder sogar unter der aller anderen Orbitale ohne z-Achsenanteil [60, 62].

Bei Komplexen mit KZ 4 können sogar das d_{z^2} - und das $d_{x^2-y^2}$ -Orbitale unter den Energieniveaus der d_{xy} -, d_{xz} - und d_{yz} -Orbitale liegen. Dadurch nähern sich die Liganden dem d_{xy} -Orbital stärker an als dem $d_{x^2-y^2}$ -Orbital und es kommt zu einer tetraedrischen Koordination (**Abbildung 9**).

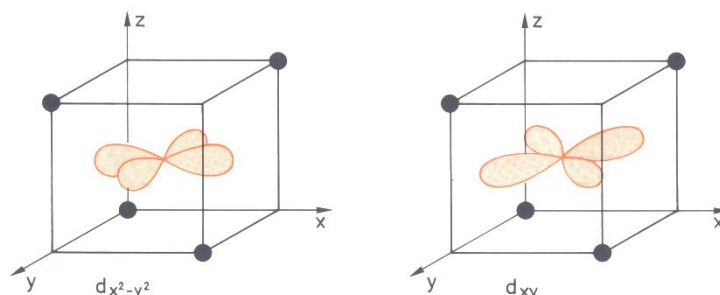


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Annäherung der Liganden (schwarze Punkte) an das $d_{x^2-y^2}$ - und das d_{xy} -Orbital nach Riedel *et al* [60].

Die Abhängigkeit der Aufspaltung und somit die resultierende Geometrie ist hauptsächlich abhängig von den Liganden. Diese können aufgrund ihrer Fähigkeit das Ligandenfeld aufzuspalten, in die sogenannte „spektroskopische Reihe“ eingeordnet werden, da mit der Aufspaltung auch eine Änderung der Färbung des Komplexes einhergeht (**Abbildung 10**).

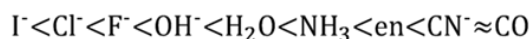


Abbildung 10 Spektroskopische Reihe der Liganden und ihre Fähigkeit d-Orbitale aufzuspalten von schwach (links) bis stark (rechts) nach Riedel *et al* [60].

Die Kristallfeldtheorie kann nicht die vollständige Reihenfolge der Liganden in der spektroskopischen Reihe vorhersagen. Während sie noch erklärt, dass Iodid-Ionen eine schwächere Aufspaltung verursachen als Fluorid-Ionen, kann sie nicht zur Deutung der stärksten Aufspaltung durch das neutrale Molekül Kohlenstoffmonoxid herangezogen werden. Diese Schwachstelle kann durch die Betrachtung mehrerer koppelter Elektronen und die Einführung der MO-Theorie ausgeglichen werden. Diese

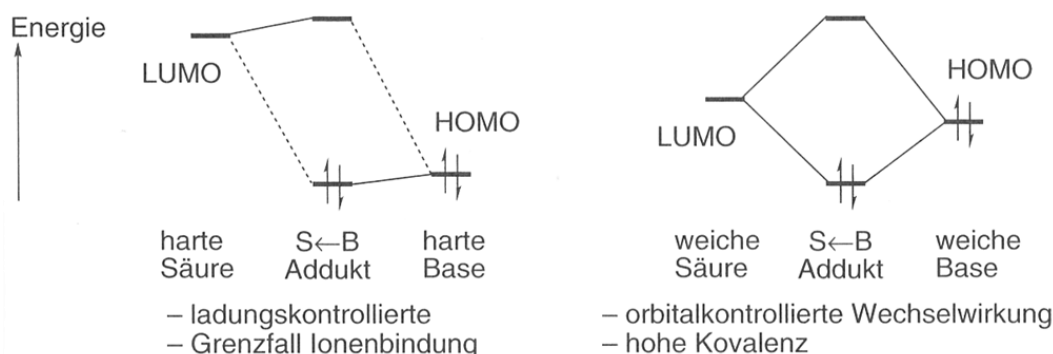


Abbildung 12 Molekülorbitalschema für Interaktion zwischen harten Säuren und Basen (links) und weichen Säuren und Basen (rechts) nach Janiak *et al.* [62]. Die großen Energieunterschiede im linken Fall führen zu ionenbindungsähnlichen Bedingungen und somit zu hauptsächlich elektrostatischen Wechselwirkungen. Im rechten Fall sind die Energieunterschiede gering, und es kommt zu einer eher kovalenten Bindung.

Physiologisch-relevante Metallionen, wie Alkali- und Erdalkalimetallionen, können durch ihre Gruppenzugehörigkeit einen harten Lewis-Säure-Charakter zugeordnet werden, der aber mit zunehmender Periode durch den größer werdenden Ionenradius und ihrer stärkeren Polarisierbarkeit einen „weicher werdenden“ Charakter aufweist (**Abbildung 11**).

Für physiologisch-relevante Metallionen der Übergangsmetalle gilt hingegen, dass diese zwischen hart und weich liegen. Ausnahmen sind Fe^{3+} -Ionen, die harte und Cu^+ -Ionen, die weiche Lewis-Säuren bilden. Typische harte Lewis-Basen sind leichte Halogenide, wie F^- und Cl^- , aliphatische Amine, H_2O , OH^- , Alkohole, Carbonsäuren und andere sogenannte „O-Liganden“. Weiche Lewis-Basen bilden dagegen schwere Halogenide wie I^- , Thioether, Thiolate, SCN^- und andere „S-Liganden“. Dazwischen liegen Br^- , NO_2^- , SO_3^{2-} und aromatische Amine [62, 63].

Diese Angaben spiegeln sich auch in den Ergebnissen von Harding *et al.* und Zheng *et al.* wieder. Beide untersuchten die typischen organischen Komplexbildungspartner von verschiedenen Lewis-Säuren durch einen systematischen Data-Mining-Ansatz. Hierbei wurde die Häufigkeit von bestimmten Teilstrukturen, wie z. B. Carboxylate oder Amine, an der Zentralteilchen-Ligand-Wechselwirkung, sowie typische Bindungslängen und Winkel für organische Verbindungen und Aminosäuren im Speziellen evaluiert [64, 65].

3.4. Metalloproteine

Der Begriff Metalloproteine umfasst eine Vielzahl von Proteinen, die sich in ihren Aufgaben unterscheiden. Die nativen Metallionenliganden übernehmen in diesen Proteinen katalytische, regulatorische oder strukturelle Funktionen [53]. Der Begriff Metalloprotein nach Roberts *et al.* grenzt sich von metallbindenden Proteinen, d.h. Proteine, die eine Transportfunktion für Metallionen erfüllen (Albumin) oder die mittels Metallionen Aggregate bilden (Tau-Protein), deutlich ab [55].

Einen großen Anteil an Metalloproteinen findet sich in der Klasse der Enzyme wieder. Andreini *et al.* berichteten, dass bei einer Datenbankrecherche von 1371 unterschiedlichen Enzymen 47 % ein Metallion benötigen und bei 40 % das Metallion sich im aktiven Zentrum befand. Am häufigsten sind Übergangsmetallionen, wie Cu^{+2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$ oder Zn^{2+} in den aktiven Zentren vertreten. Es finden sich in einem geringeren Umfang auch andere Metallionenspezies, z.B. selen-, wolfram- und molybdänhaltige Ionen, in unterschiedlichen Oxidationsstufen und Zusammensetzung wieder [66].

Eine weitere Unterteilung der Enzyme kann in einkernige und mehrkernige Metallionenkomplexe erfolgen. Die Einordnung richtet sich hier nach der Anzahl der benötigten Metallionenkomplexe, um eine Katalyse durchzuführen. Bei mehrkernigen Enzymen kommt es zu einer Kooperation zwischen den Metallionenkomplexen in einem aktiven Zentrum [62].

Besonders kupfer- und zinkhaltige Metalloproteine spielen wichtige Rollen. Während der Kupferstoffwechsel durch einen häufigen Wechsel der Oxidationszahlen +II und +I gekennzeichnet ist und Cu^{2+} unter physiologischen Bedingungen redoxaktiv ist, ändert Zn^{2+} seine Oxidationszahl nicht [62]. Diese Eigenschaften spiegeln sich auch in den Funktionen ihrer Metalloproteine wieder. Kupferhaltige Proteine sind häufig an Elektronentransferprozessen und der enzymatischen Umsetzung von Sauerstoff beteiligt, während zinkhaltige Proteine meist Substitutionsreaktionen katalysieren und an Interaktionen zwischen biologischen Makromolekülen beteiligt sind, wie z.B. als Transkriptionsfaktoren bei der Proteinbiosynthese [62].

Die unterschiedlichen Kupferproteine können aufgrund ihrer spektroskopischen und strukturellen Eigenschaften, in unterschiedliche Klassen von Kupferzentren eingeordnet werden (**Abbildung 13**). Typ 1, oder auch „blaues Kupfer“ genannt, findet man hauptsächlich in Metalloproteinen, die in Elektronentransferprozessen involviert sind vor. Hier liegt das Kupferion in einem tetraedrisch-verzerrtem Komplex, also zwischen der von Cu^+ bevorzugten tetraedrischen Geometrie und der von Cu^{2+} favorisierten quadratisch-planaren Koordination, vor. Diese Geometrie bewirkt ein stark positives Redoxpotential für die Oxidation von Cu^+ zu Cu^{2+} . Diese Oxidation führt, aufgrund der Geometrie, nur zu einer geringen Veränderung der Struktur des Proteins. Typisch für diese Kupferzentren ist eine Koordination über zwei *L*-Histidyl-, einem anionischen *L*-Cysteinyl- und einem elektrisch neutralem *L*-Methionylrest (**Abbildung 13**). Aufgrund von CT-Übergängen zwischen dem Kupferion und den Schwefelatomen von *L*-Cysteinyl- bzw. *L*-Methionylresten können im sichtbaren Wellenlängenbereich d-d-Elektronen-Übergänge beobachtet werden, welche die Blaufärbung bedingen [62]. Ein Vertreter dieser Gruppe ist das Plastocyanin (**Abbildung 13**). Es ist Teil des Photosyntheseapparates und bildet eine Brücke zwischen dem Photosynthesesystem II und I mittels Eielektronentransfers [67].

„Nicht-blaues Kupfer“ oder Typ 2 kupferzentrenhaltige Proteine kennzeichnet ein quadratisch-planar koordiniertes Cu^{2+} , das auch einen fünften Ligand schwach binden kann (**Abbildung 13**). In diesem Fall wird die Geometrie als quadratisch-pyramidal beschrieben. Typ 2 Kupferzentren sind häufig ein zentraler Bestandteil von sauerstoffaktivierenden Enzymen und weisen, im Gegensatz zu den Typ 1 Kupferproteinen, nur schwache d-d-Elektronen-Übergänge im sichtbaren Wellenlängenbereich auf [62]. Einer der wichtigsten Vertreter dieser Gruppe ist die Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase, dieses Enzym setzt, mit Hilfe des Kupferzentrums (**Abbildung 13**) O_2^- -Ionen in O_2 bzw. H_2O_2 um [68].

Der Typ 3 zeichnet sich durch zwei Kupferionen im Zentrum des Komplexes aus (**Abbildung 13**). Im oxidierten Zustand sind diese beiden Kationen über einen Liganden verbrückt. Dies führt zu einer antimagnetischen Kopplung zwischen den beiden Metallionen und ist daher elektronenspinresonanzspektroskopisch inaktiv (ESR-inaktiv). Diese Eigenschaft unterscheidet Typ 3 von den Typen 1 und 2 [62]. Ein Beispiel für einen Vertreter dieser Klasse ist das Hämocyanin (**Abbildung 13**). Es kann Sauerstoff binden und bildet daher das Sauerstofftransportsystem in der Hämolymphe vieler Mollusken und Arthropoden [69].



Hingegen wird bei negativgeladenen Resten die positive Ladung am zentralen Zn^{2+} -Ion reduziert und es ist eine weitere Base für die Deprotonierung des Wassermoleküls nötig (**Abbildung 14 Weg B**) [62].

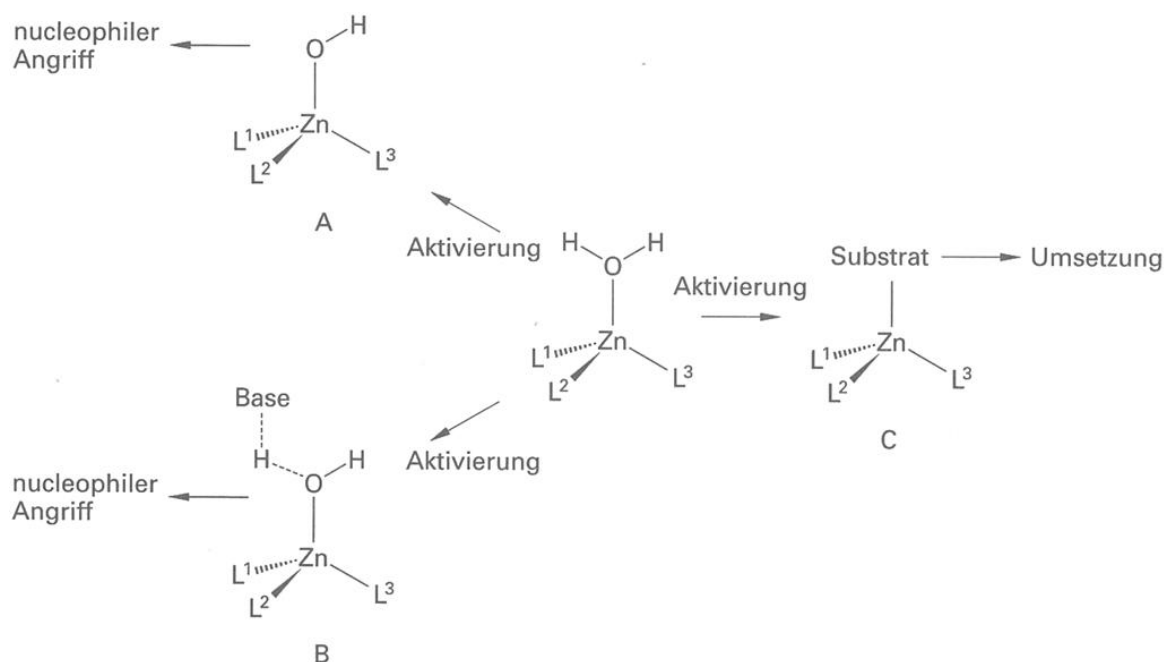


Abbildung 14 Übersicht über die drei möglichen Mechanismen von Zinkenzymen nach Janiak *et al.* [62]. Weg A zeigt eine Deprotonierung von H_2O mit anschließendem nukleophilen Angriff. Weg B stellt eine Variante dar, die den pK_s -Wert von H_2O weniger stark senkt und eine Base benötigt um es zu deprotonieren. Weg C veranschaulicht eine direkte Bindung des Substrates an das Zn^{2+} -Ion mit anschließender Umsetzung.

4. Kapillarelektrophorese

Die kapillarelektrophoretischen Techniken sind, neben der klassischen Gelelektrophorese, die am weitesten verbreiteten elektrophoretischen Trenntechniken. Sie werden neben der Trennung von Stoffgemischen auch zur Untersuchung von Affinitäten zwischen unterschiedlichen Stoffen und zur Bestimmung von deren Bindungskonstanten verwendet [70–72]. Hierfür wird das unterschiedliche Verhalten der Stoffe im elektrischen Feld genutzt, deren Prinzipien im Folgenden näher erläutert werden.

4.1. Physikalische Grundlagen der elektrophoretischen Trennung

Die Trennung der Stoffe durch Elektrophorese basiert auf der einfachen Grundlage, dass beim Anlegen einer Spannung an eine Elektrolytlösung (BGE) gelöste, positivgeladene Kationen in Richtung Kathode und negativgeladene Anionen in Richtung Anode wandern. Neutrale Moleküle zeigen hierbei keine gerichtete Bewegung zu einer Elektrode hin. Die elektrophoretische Mobilität der geladenen Teilchen ist aber nicht nur von ihrer Gesamtladung abhängig, sondern auch von ihren effektiven Radii, der aus den Radii der Teilchen und ihrer Solvathülle besteht (**Formel 4-1**).

$$\mu = \frac{q_{eff}}{6\pi\eta r}$$

Formel 4-1

μ : Elektrophoretische Mobilität $\left[\frac{m^2}{V \cdot s}\right]$

q_{eff} : effektive Ladung des Teilchens $[C]$

η : Viskosität der Lösung $\left[\frac{kg}{m \cdot s}\right]$

r : effektiver Radius des Teilchens $[m]$

Aus den Einheiten der elektrophoretischen Mobilität ist auch ersichtlich, dass die tatsächliche Wanderungsgeschwindigkeit zusätzlich von der Viskosität der Lösung und vom elektrischen Feld und somit von der angelegten Spannung abhängig ist (vgl. **Formel 4-1**). Folglich erhöht sich die Bewegungsgeschwindigkeit der geladenen Teilchen bei Erhöhung der angelegten Spannung.

Die Verwendung von Quarzglaskapillaren mit geringem Innendurchmesser (i. d. R. 20 – 100 μm), wie bei der Kapillarelektrophorese zur Trennung von Teilchen verwendet werden, zeigt noch zusätzliche Vorteile. Aufgrund des geringen Durchmessers ist der Temperaturunterschied zwischen Kapillarrinnenraum und Wand sehr gering und es kommt zu einer geringeren lateralen Diffusion der Migrationszonen von einzelnen Analyten [73]. Des Weiteren ist auch ein günstigeres Strömungsprofil der sich bewegenden Teilchen zu erkennen. Während bei deutlich größeren Durchmessern und pumpengesteuerten Systemen, wie z. B. in der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), die Bewegungsgeschwindigkeit, aufgrund eines konvexen Strömungsprofils, an der Wandung geringer ist als in der Mitte des Lumen, ist bei geringen Durchmessern ein stempelförmiges Profil zu beobachten.

Dieses Profil hat den Vorteil, dass es zu einer geringeren Peakverbreiterung während der Trennung kommt und somit eine höhere Auflösung erreicht werden kann [73, 74]. Auch hier gibt es Einschränkungen. Bei einem sehr geringen Innendurchmesser können stärkere Abweichungen von diesem Profil auftreten ($< 20 \mu\text{m}$).

Ein weiterer Grund für das Auftreten dieses Strömungsprofil sind auch die deprotoniert vorliegenden Silanol-Gruppen der Kapillarinneiwände. Diese führen zu einem weiteren Effekt, der als elektroosmotischer Fluss (EOF) bekannt ist. Prinzipiell beruht dieser auf einem Überschuss positivgeladener Teilchen im beweglichen Kapillarvolumen in der Nähe der Wand, das die negative unbewegliche Ladung der Silanol-Gruppen ausgleicht. Beim Anlegen einer Spannung wandert dieser Fluss an Teilchen unter Mitnahme von Lösungsmittelmolekülen in Richtung Anode [73, 75]. Der EOF führt, je nach Ausprägung, nicht nur zu einer Mitnahme der Lösungsmittelmoleküle in Richtung Anode, sondern auch von Neutralteilchen und Kationen. Hierbei summieren sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen in Richtung Anode und der EOF auf. Somit können sowohl positivgeladene, negativgeladene als auch neutrale Teilchen mittels Detektor auf der Anodenseite detektiert werden. Da die Eigenmobilität vom Verhältnis von Größe zu Ladung (Größen-Ladungs-Verhältnis) jedes Analyten abhängt, ergibt sich folgende Detektionsreihenfolge:

1. Kleine, hochgeladene Anionen
2. Kleine Anionen / hochgeladene große Anionen
3. Große Anionen
4. Neutrale Teilchen
5. Kleine, niedriggeladene Kationen
6. Große, niedriggeladene Anionen
7. Große, hochgeladene Anionen / Kleine, hochgeladene Anionen

Durch Zusatz von weiteren Substanzen, wie z. B. chirale Selektoren und Liganden für mögliche Bindungspartner, oder die Änderung der Zusammensetzung der Elektrolytlösung, wie z. B. eine Erhöhung der Viskosität oder das Anlegen eines pH-Gradienten innerhalb der Kapillare können auch andere Anwendungsgebiete als eine Separation basierend auf unterschiedlichen Größen-Ladungs-Verhältnissen genutzt werden. Auch ist die Verwendung von Kapillarelektrophorese als eine Dimension in einer mehrdimensionalen Trennung möglich und findet in Gebieten Anwendung, die eine Analyse komplexer Proben erfordert, hier ist z. B. Metabolomics (Analyse aller Metaboliten einer Zelle) zu nennen [76, 77].

4.2. Techniken der kapillarelektrophoretischen Trennung

Einige Techniken der kapillarelektrophoretischen Trennungen, wie z. B. die Trennung von Proteinen nach ihrer Größe mittels Natriumdodecylsulfat, isotachophoretische Trennungen (cITP) oder isoelektrische Fokussierung, wurden von der klassischen Gelelektrophorese auf Kapillaren übertragen. Auch Hybridtechniken, wie die mizellare elektrokinetische Chromatographie, die die elektrokinetische Separation mit der Verteilung zwischen stationärer (Mizellen) und mobiler Phase (BGE) vereint, werden in der Kapillarelektrophorese angewendet [78, 79].

Ein Großteil dieser kapillarelektrophoretischen Techniken basiert auf den Grundlagen der Kapillarzonen-elektrophorese (CZE). Das gilt auch für Trennung mittels chiralen Selektoren, welche z. B. Cyclodextrine sein können, oder für Affinitätskapillarelektrophoretischen Methoden. Dabei ist allen Techniken der instrumentelle Aufbau gemein (vgl. **Abbildung 15**).

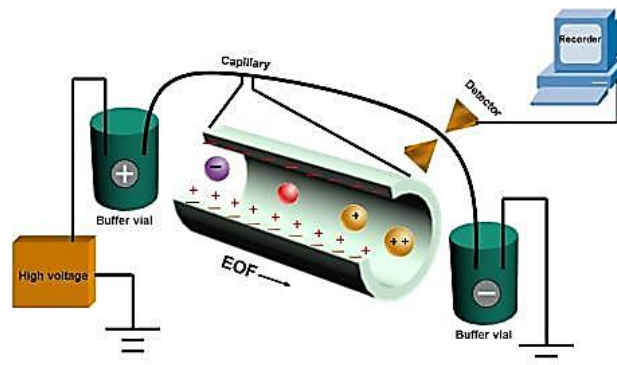


Abbildung 15 Schematischer Aufbau eines Kapillarelektrophoresegerätes mit Hochspannungsquelle („High voltage“), Puffereinlassgefäß („Buffer vial“ mit „+“), Pufferauffanggefäß („Buffer vial“ mit „-“), Kapillare („Capillary“), Detektor („Detector“) und Datenschreiber („Recorder“) nach Internetzusammenfassung von Yu *et al.* [80].

Alle Kapillarelektrophoresegeräte besitzen als Minimalausstattung ein Einlassgefäß, ein Auffanggefäß, eine Glaskapillare, die beide Gefäße verbindet, eine Hochspannungsquelle, einen Detektor und einen Datenschreiber.

Die Injektion des Analyten in die Kapillare kann über unterschiedliche Techniken erfolgen. Die am häufigsten verwendeten sind hierbei die hydrodynamische und die elektrokinetische Injektion. Auch von der Anwendung einer hydrostatischen Injektion mittels Siphon-Prinzip wird berichtet [73, 78]. Die hydrodynamische Injektion kann auf zwei Weisen erfolgen, entweder durch Anlegen eines Überdruckes auf das Einlassgefäß oder durch Anlegen eines Unterdruckes auf das Pufferauffanggefäß. In beiden Fällen befindet sich der Analyt im Einlassgefäß. Die elektrokinetische Injektion beruht auf den gleichen Mechanismen wie die elektrophoretische Trennung. Mittels Anlegen einer Spannung wird die Probe in die Kapillare gebracht. Es tritt auch hier ein EOF auf. Zusätzlich werden während der Injektion je nach Polung entweder Anionen (Anode am Auffanggefäß) oder Kationen (Kathode am Auffanggefäß) aufgrund der höheren Migrationsgeschwindigkeit angereichert.

Um die Robustheit und die Flexibilität der verwendeten Kapillaren zu erhöhen, sind diese mit einer UV-undurchlässigen Außenummantelung aus Polyimid umkleidet. Um trotz der Ummantelung Analyten detektieren zu können, wird für den Detektor ein Fenster in die Polyimidummantelung gebrannt, das sogenannte Detektorfenster [78].

Für die Trennung sind neben den Spezifikationen der Glaskapillare, Innendurchmesser und eine mögliche Innenbeschichtung, auch zwei Längen wichtig, die Gesamtlänge der Kapillare (entscheidet über Stärke des elektrischen Feldstärkes) und die Länge bis zum Detektorfenster (entscheidend für Auflösung und Analysendauer).

4.2.1. Kapillarzonen-elektrophorese

Die Kapillarzonen-elektrophorese zeichnet sich, im Gegensatz zur cITP, durch eine kontinuierliche Pufferzusammensetzung, einen gleichbleibenden pH-Wert und eine konstante Ionenstärke aus. Dadurch bleibt das elektrische Feld über die gesamte Länge der Kapillare konstant, und es erfolgt eine

ausschließliche Trennung nach Größen-Ladungsverhältnis und somit nach unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Analyten (im Gegensatz zu cITP, hier wandern alle Ionen mit gleicher Geschwindigkeit) [78].

4.3. Affinitätselektrophoretische Methoden

Die Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit durch unterschiedliche Größen-Ladungsverhältnisse werden sich bei den affinitätskapillarelektrophoretischen Methoden zunutze gemacht, da bei einer Interaktion zwischen Zentralteilchen und Ligand die Masse des Komplexes größer ist als von dem Zentralteilchen alleine. Zusätzlich kann sich die Gesamtladung des Komplexes von der des Zentralteilchens unterscheiden. Dies führt zu einer Änderung des Größen-Ladungs-Verhältnisses und somit der beobachteten Migrationszeit für den Komplex im Vergleich zu dem detektierten, nicht-interagierenden Bindungspartner.

Die affinitätskapillarelektrophoretischen Methoden lassen sich in fünf unterschiedliche Ansätze unterteilen, die Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophorese (ACE), die Hummel-Dreyer-Affinitätskapillarelektrophorese (HD), „frontal analysis“-Affinitätskapillarelektrophorese (FA), die „vacancy peak“-Affinitätskapillarelektrophorese (VP) und die „vacancy“-Affinitätskapillarelektrophorese (VACE) [70, 81, 82].

Diese unterschiedlichen Ansätze können wiederum nach den Parametern gruppiert werden, die zur Bestimmung von Affinitäten notwendig sind. Während HD und VP auf Peakflächen zur Auswertung angewiesen sind, wird bei FA die Peakhöhe evaluiert, und sowohl VACE als auch ACE beziehen sich auf die Peakform und die Änderung der elektrophoretischen Mobilität [70, 71, 81, 82]. Die benötigten Parameter spiegeln sich in den erhaltenen Informationen wieder. Bei unterschiedlichen Konzentrationen des Bindungspartners ist für die Auswertung der Peakflächen eine Kalibrierung notwendig, da hiermit auch Assoziationskonstanten für den Komplex berechnet werden können (HD, VP, FA, VACE, ACE) und die Anzahl der Bindungsstellen bestimmt werden kann (HD, VP, FA, VACE) [12]. Die Vorteile, der in dieser Arbeit verwendeten Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophorese, liegen in anderen Bereichen und werden im Folgenden näher erläutert.

4.3.1. Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophorese

Die Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophorese bietet im Vergleich zu den anderen affinitätskapillarelektrophoretischen Methoden den Vorteil, dass sie aufgrund ihrer kurzen Analysenzeiten, des einfachen Versuchsaufbaus, die leichte Auswertung der Elektropherogramme und die Korrekturmöglichkeiten für Schwankungen innerhalb einer Messreihe, schnell Aussagen über eine mögliche Interaktion liefert [70, 81].

Das zugrundeliegende Prinzip liegt in der Änderung der elektrophoretischen Mobilität nach Bildung eines Komplexes des Analyten mit einem Bindungspartner. Da die elektrophoretische Mobilität nicht direkt beobachtet werden kann, wird stattdessen die Migrationszeit einer der beiden Bindungspartner gemessen und die Zeiten zwischen Anwesenheit und Abwesenheit des anderen Liganden verglichen [70].

Um ein Signal für den zu beobachteten Bindungspartner zu detektieren, wird dieser vor Beginn der eigentlichen Messung in einer kleinen Menge injiziert. Der zweite Bindungspartner wird dem BGE zugesetzt und befindet sich bereits im Überschuss in der Kapillare [81].

Um die Schwankungen des EOFs zu berücksichtigen, wird in der Analytenlösung eine neutrale Substanz gelöst. Diese Substanz dient als EOF-Marker, da sie aufgrund der fehlenden Eigenladung mit diesem mitmigriert. Somit können die gemessenen Migrationszeiten auf die Zeit des EOF-Markers normalisiert werden und damit die Schwankungen des EOFs negiert werden [70].

Die Möglichkeit Bindungskonstanten zu berechnen, ist mit Einschränkung auch für ACE möglich. Während die anderen affinitätskapillarelektrophoretischen Methoden dies für jedes Bindungsverhältnis können, ist dies für ACE zwar mit fünf verschiedenen mathematischen Bestimmungsmethoden aber nur für ein Bindungspartnerverhältnis von 1:1 möglich [81, 83]. Somit eignen sich diese Berechnungsmethoden nicht für die Untersuchung von Protein-Metallionen-Interaktionen, da meist mehr als eine spezifische, und auch teilweise weitere unspezifische, Bindungsstellen vorliegen, wie z. B. bei humanen Serumalbumin [7, 70, 84]. Es treten auch weitere Besonderheiten bei diesen Untersuchungen auf.

4.3.2. Besonderheiten der Untersuchung von Protein-Metallionen-Wechselwirkungen

Die Besonderheiten der Bestimmung von Protein-Metallionen-Wechselwirkungen liegen in der Anwesenheit von Metallionen in der Kapillare bzw. im BGE. Viele Metallsalze haben einen starken Einfluss auf den EOF, der die Verwendung von EOF-Markern unabdingbar macht (vgl. **Abbildung 16**) [75].

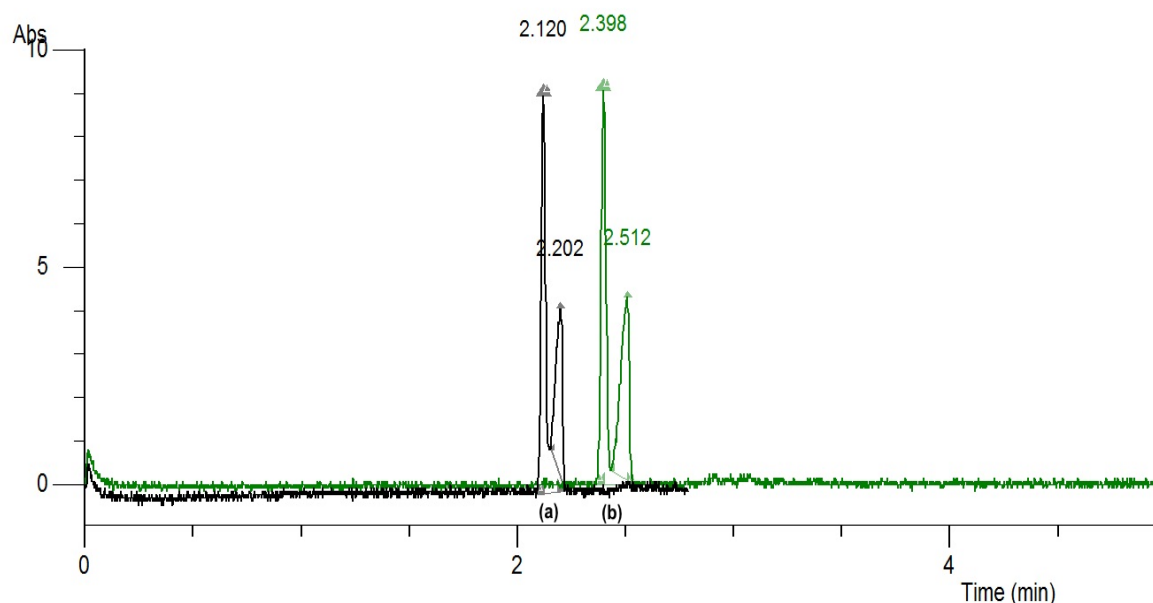


Abbildung 16 Beispiel für den Einfluss der Ionenstärke auf den EOF. Die Migrationszeiten des EOF-Markers (2.120 bzw. 2.398) und des Analyten (2.202 bzw. 2.512) verschieben sich in Gegenwart von 500 $\mu\text{mol/L}$ Ba^{2+} -Ionen (b) im Vergleich zu reinem Tris-Puffer zu späteren Zeiten.

Diese Veränderungen der gemessenen Migrationszeiten geschehen aber nicht nur durch Erhöhung der Ionenstärke des BGE, sondern auch durch Interaktionen mit freien Silanol-Gruppen der Kapillareninnenwand und werden durch die Verwendung von Chelatbildnern zum Spülen der Kapillare deutlich. Ohne Verwendung eines Komplexbildners ist bei Betrachtung der Migrationszeiten einer Messreihe ein deutlicher Drift zu erkennen, der durch einen optimierten Spülschritt stark reduziert werden kann, da gebundene Metallionen komplexiert und somit entfernt werden [61].

Nichtsdestotrotz, sind Metallionen nicht die einzigen Spezies, die bei diesen Experimenten mit der Kapillarinnenwand interagieren können. Auch Proteine interagieren mit dieser und müssen durch Spülprozeduren entfernt werden [7, 70].

Auch Komplexbildungen zwischen Puffer und Metallionen wurden in der Literatur beschrieben [85–87]. Ein Ausweichen auf ein anderes Puffersystem bietet bei einem kompletten Screening (bei physiologischem pH-Wert) von Alkali-, Erdalkali- und Übergangsmetallionen keinen Vorteil, da die Eigenschaften der verschiedenen Ionen, so unterschiedlich sind, dass Interaktionen mit fast allen geeigneten Puffersystem auftreten werden [85]. Dies ist bei geplanten Messungen zu beachten, da hierdurch die effektive Konzentration an Metallionen gegenüber der gewünschten reduziert sein kann.

Neben diesen Interaktionen, die sich in den normalisierten Migrationszeiten widerspiegeln können, postulierten Křížek *et al.* eine Interaktion zwischen Metallionen in hohen Konzentrationen und EOF-Markern [88]. Diese Interaktionen sind nicht eindeutig von Fluktuationen im EOF oder Änderungen aufgrund höherer Salzkonzentrationen zu unterscheiden und können eine fehlende bzw. eine signifikante Interaktion vortäuschen. Aus diesem Grund müssen, zur Verifizierung der ACE-Ergebnisse, diese Interaktionen mit Metallionen auch in den hierbei üblichen Konzentrationen untersucht werden, und die Untersuchung auch auf mögliche alternative EOF-Marker ausgeweitet werden.

4.3.2.1. Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Metallionen und EOF-Marker

Die von Křížek *et al.* vorgeschlagene Untersuchungsmethode wurde für diese Experimente abgelehnt. Dies geschah aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten (RSD% < 3,4 %), die mit dieser Methode erreicht werden konnte und der deutlich stärkeren Schwankung (RSD% > 30 %), die die Ergebnisse der verwendete Formel aufweisen (vgl. **Formel 4-2**).

Die Methode sah vor, dass neben dem EOF-Marker ein Analyt (N-Methylacetamid oder auch NMA) und das untersuchte Metallion der Probenlösung zugesetzt wird. Dieser dient als interne Referenz für die Untersuchungen. Dieses Gemisch wurde in eine 80 cm lange Quarzglaskapillare injiziert und 15 min bei 15 kV getrennt. Anschließend wurde der metallionenhaltige BGE in den Gefäße am Ende der Kapillare gegen frischen getauscht und diese Prozedur viermal wiederholt. Zum Schluss wurde eine wässrige Lösung des EOF-Markers injiziert und mit einem Druck von 5 kPa (= 50 mbar) bis zur Detektion des Marker-Peaks durch die Kapillare gepumpt [88].

$$\Delta\mu_{salt}^{S,M} = \mu_{salt}^S - \mu_{salt}^M = \frac{(t_M - t_S) * l_d}{(t_{M2} - t_S) * l_U} * \frac{l_c}{U}$$

Formel 4-2

$\Delta\mu_{salt}^{S,M}$: Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität zwischen dem Analyten und dem EOF-Marker in Anwesenheit eines Metallsalzes $\left[\frac{m^2}{V*s}\right]$

μ_{salt}^S : Elektrophoretische Mobilität des Analyten in Anwesenheit eines Metallsalzes $\left[\frac{m^2}{V*s}\right]$

μ_{salt}^M : Elektrophoretische Mobilität des EOF-Markers in Anwesenheit eines Metallsalzes $\left[\frac{m^2}{V*s}\right]$

- t_M : Migrationszeit der ersten EOF-Markerinjektion [s]
 t_{M2} : Migrationszeit der zweiten EOF-Markerinjektion [s]
 t_S : Migrationszeit des Analyten [s]
 l_d : Länge der Kapillare bis Detektor [m]
 l_U : Entnommen aus der Formel des Originalartikels [88];
 Aus dem Text geht hervor, dass es sich um t_u handeln muss.
 l_C : Gesamtlänge der Kapillare [m]
 U : elektrische Spannung [V]
 t_u : Zeitraum über den die Spannung angelegt wurde [s]

Aufgrund dieser Diskrepanz in den relativen Standardabweichungen der Mess- und Rechenergebnissen wurde eine einfachere Methode verwendet, in der in aufeinanderfolgenden Läufen abwechselnd der untersuchte EOF-Marker und Wasser injiziert wurden. Die Wasserinjektionen dienten als Referenzwert für einen Ausgleich der Schwankungen im EOF mittels Adjustierung der EOF-Markermigrationszeiten. Anschließend wurde der Migrationszeitunterschied des Markers in Anwesenheit und Abwesenheit der Metallsalze $MgCl_2$, $BaCl_2$, $CaCl_2$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $NiCl_2$ und $NaSCN$ evaluiert und mit ihren Konfidenzintervallen ($\alpha = 2,5\%$) graphisch für Acetanilid und Dimethylsulfoxid (DMSO) ausgewertet (vgl. **Abbildung 17** und **Abbildung 18**). Zusätzlich wurde für DMSO die Untersuchung der Wechselwirkung mit 1500 $\mu mol/L$ $NaSCN$ durchgeführt.

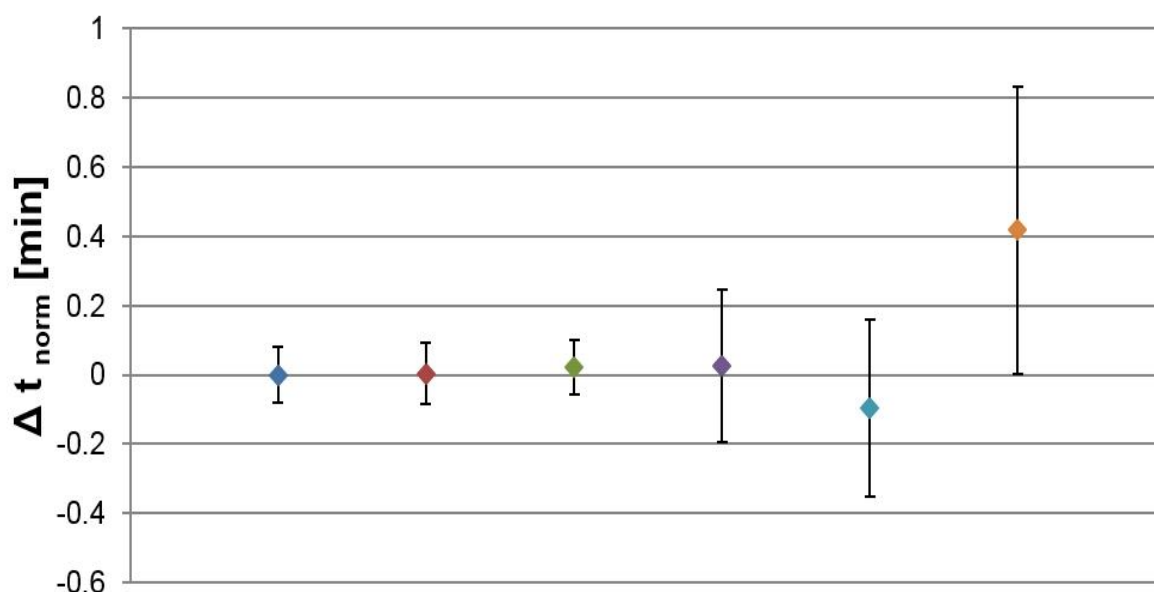


Abbildung 17 Übersicht über normalisierte Migrationszeitunterschiede von Acetanilid in Gegenwart von Ba^{2+} - (dunkelblau), Mg^{2+} - (rot), Ca^{2+} - (grün), Cu^{2+} - (lila), Zn^{2+} - (türkis) und Ni^{2+} -Ionen (orange) mit ihren Konfidenzintervallen für ein α -Fehler von 2,5%. Es wurde eine Konzentration für die untersuchten Ionen von 500 $\mu mol/L$ verwendet (Ausnahme: 50 $\mu mol/L$ Zn^{2+}).

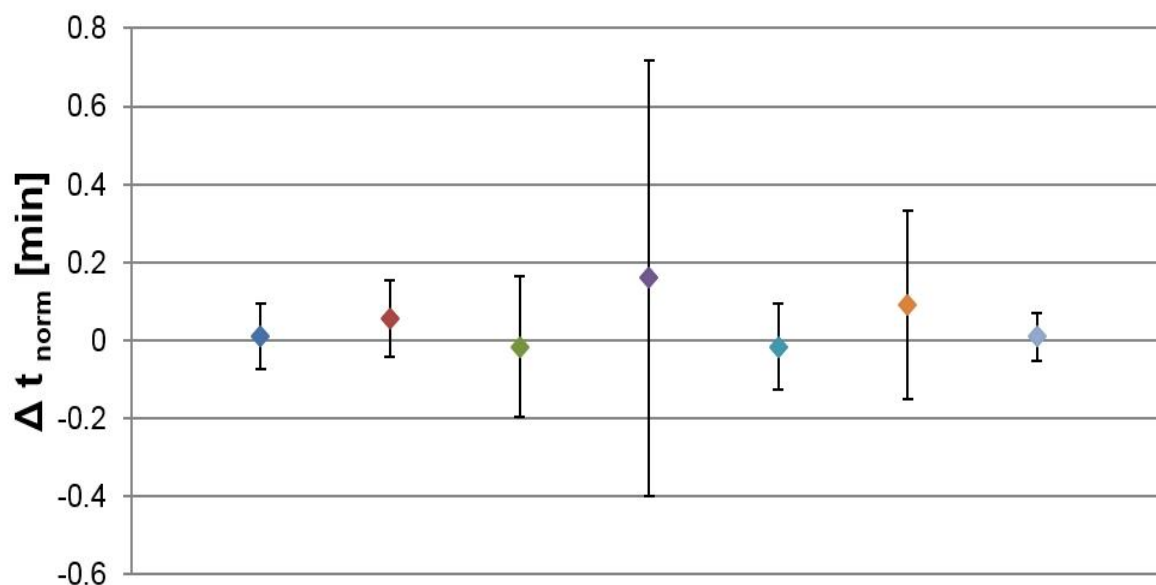


Abbildung 18 Übersicht über normalisierte Migrationszeitunterschiede von DMSO in Gegenwart von Ba^{2+} - (dunkelblau), Mg^{2+} - (rot), Ca^{2+} - (grün), Cu^{2+} - (lila), Zn^{2+} - (türkis), Ni^{2+} -Ionen (orange) und SCN^- -Ionen mit ihren Konfidenzintervallen für ein α -Fehler von 2,5%. Es wurde eine Konzentration für die untersuchten Ionen von 500 $\mu\text{mol/L}$ verwendet (Ausnahme: 50 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} und 1500 $\mu\text{mol/L}$ SCN^-).

Die Ergebnisse der Experimente mit Acetanilid und DMSO zeigen für die untersuchten Metallionen keine signifikanten Änderungen der Migrationszeit und somit keine der durch Komplexion hervorgerufenen Veränderungen der elektrophoretischen Eigenmobilität der EOF-Marker. Auch blieb die von Křížek *et al.* postulierte starke Auswirkung von 1500 $\mu\text{mol/L}$ NaSCN auf DMSO aus [88].

Lediglich Ni^{2+} zeigt für Acetanilid eine Änderung, die aber nicht auf eine Wechselwirkung zwischen Acetanilid und dem Metallion zurückzuführen ist, sondern auf eine Wechselwirkung zwischen dem Ion und der Kapillarwand. Dies lässt sich leicht anhand der adjustierten Migrationszeiten erklären, da sich die Migrationszeiten für Acetanilid in Anwesenheit und Abwesenheit von Ni^{2+} kaum ändert. Im Gegensatz dazu wurde für Wasser ein deutlicher Drift der Migrationszeitunterschiede zwischen Anwesenheit und Abwesenheit von Ni^{2+} innerhalb der Messreihe um den Faktor 8 gemessen.

Auch Zn^{2+} zeigt einen ähnlichen Effekt für die DMSO-Experimente auf. Die unvollständige Entfernung des Ions durch die Spülschritte führte zu kürzeren Migrationszeiten für das injizierte Wasser, während die Migrationszeiten von DMSO nur den üblichen Schwankungen unterlag (vgl. **Abbildung 19**).

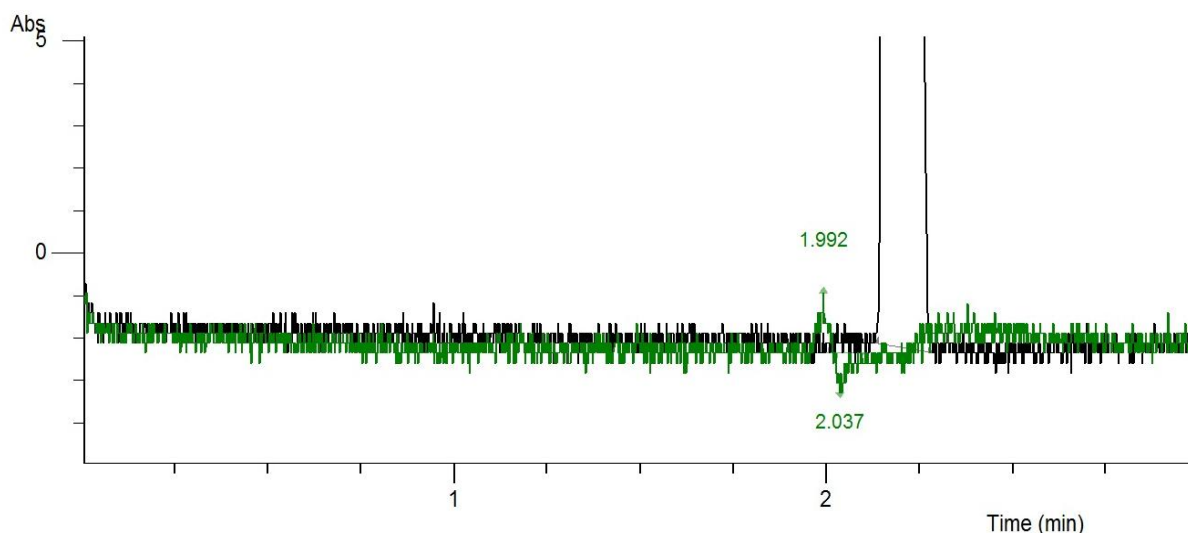


Abbildung 19 Vergleich der Elektropherogramme der Wasserinjektion (grün) und der DMSO-Injektion (schwarz) in Anwesenheit von 50 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} . Es ist zu erkennen, dass der „vacancy“-Peak von Wasser (2.037) zeitlich vor dem Acetanilid-Peak (abgeschnittener Peak) detektiert wurde. Dies konnte durch einen Vergleich mit den Migrationszeiten von Wasser aus vorherigen Läufen ohne Zn^{2+} auf eine Abnahme der Migrationszeit zurückgeführt werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass eine Adjustierung des EOF-Markerpeaks um eine Auswertung von Protein-Metallionen-Interaktionen mittels ACE nicht notwendig ist, um die Richtigkeit der Ergebnisse zu erhöhen, da keinerlei Auswirkungen auf den EOF-Marker gefunden wurden, lediglich auf die elektrophoretische Mobilität des injizierten Wassers.

Obwohl sich der feste Bezugspunkt für die ACE-Auswertungen nicht ändert, sind die Auswirkungen von Zn^{2+} - und Ni^{2+} -Ionen nicht ganz eindeutig. Da eigentlich das Wasser den EOF markieren soll, ist es schwer zu sagen, ob durch eine Interaktion sich die Migrationszeiten der EOF-Marker nicht ändern oder ob tatsächlich der „vacancy“-Peak des Wassers nun nicht mehr im Bereich des EOFs migriert. Um dies zu ermitteln sind noch weitere Untersuchungen nötig.

Hierzu empfiehlt es sich, das System um einen weiteren Analyten zu erweitern, der mit den Ionen Zn^{2+} und Ni^{2+} , nach Möglichkeit, nicht interagiert aber auch nicht in der Zone des EOF-Markers migriert. Diese Aufgabe könnten kleine Kationen erfüllen, da hier von einer Abstoßung zwischen dem Analyten und den Metallionen ausgegangen werden kann, und es nicht zu einer Interaktion durch Polarisierung des Analyten kommen könnte.

5. Molecular Modeling

5.1 Grundlagen der Methoden des Molecular Modelings

Die Verwendung von Modellen zur Beschreibung der Struktur von Molekülen ist eine seit langer Zeit verwendete Technik. Durch die zunehmende Verbesserung der Computerleistung ist es nun möglich nicht nur rein deskriptive Modelle, wie z. B. das plastische DNS-Modell von Watson & Crick, das die Doppelhelixstruktur der DNS wiedergibt, zu generieren, sondern auch, mit Hilfe experimenteller Daten, prospektiv Eigenschaften und Verhalten von Elementen, Ionen und Molekülen zu extrapolieren [89–91]. Die verwendeten Methoden unterscheiden sich nicht nur in ihrer Präzision, sondern auch in ihrem Rechenaufwand. Daher ist die Wahl der Methode immer ein Kompromiss zwischen Genauigkeit des Modells und Zeitaufwand.

Man kann die Methoden in 4 Gruppen einteilen: molekülmechanische Methoden (MM), quantenmechanische Methoden (QM), moleküldynamische Methoden (MD) und weitere Methoden wie z. B. Datenbanksuchen, Clusteranalyse, „Free Energy Perturbation“ und QSAR [92].

5.2. Methoden zur Modellentwicklung

5.2.1. Prinzipien der molekülmechanischen Berechnungen

Im Vergleich zu den anderen Methoden beschreiben molekülmechanische Berechnungen die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Atomen eines Moleküls bzw. zwischen unterschiedlichen Molekülen am wenigsten genau. Dennoch haben diese Methoden ihre Daseinsberechtigung. Können kleine Systeme, wie z.B. kleine anorganische und organische Moleküle mit einer Masse von wenigen hundert Dalton, deutlich präziser mit *ab-initio*- und semi-empirischen Methoden beschrieben werden, steht der Zeitaufwand für größere Systeme wie Proteine, die eine Masse von mehreren Kilodalton haben können, in keinem Verhältnis zu den zusätzlich gewonnen Erkenntnissen.

Die Berechnungen beruhen auf einem vereinfachten Molekülmodell, das Atomkerne als Kugeln mit einer bestimmten Masse und Ladung betrachtet, während chemische Bindungen als mechanische Federn charakterisiert werden. Diese verhalten sich ähnlich wie anharmonische Oszillatoren, da chemische Bindungen bis zu einem gewissen Maß dehnbar bzw. stauchbar sind [89, 90, 92].

Die Struktur eines Moleküls wird bei diesen Methoden durch eine Minimierung der Verzerrungsenergie (sog. „strain energy“) berechnet. Die Verzerrungsenergie ist ein Teil der inneren Energie eines Moleküls, die die Deformation von idealen Bindungslängen und -winkeln widerspiegelt. Die Verzerrungsenergie kann, wie in **Formel 5-1** zu sehen ist, aus der Summe von 8 verschiedenen Energietermen beschrieben werden [92].

$$U_{\text{Gesamt}} = E_b + E_\theta + E_\phi + E_{b\theta} + E_{nb} + E_\delta + E_\varepsilon + E_{hb}$$

Formel 5-1

U_{Gesamt} : Gesamte Verzerrungsenergie $\left[\frac{\text{J}}{\text{mol}}\right]$

E_b : Bindungslängendeformationsenergie $\left[\frac{\text{J}}{\text{mol}}\right]$

E_θ : Bindungswinkeldeformationsenergie $\left[\frac{J}{mol}\right]$

E_ϕ : Torsionswinkelenergie $\left[\frac{J}{mol}\right]$

$E_{b\theta}$: Wechselwirkungsterm für Bindungslängen- und Bindungswinkeldeformationsenergie $\left[\frac{J}{mol}\right]$

E_{hb} : Van-der-Waals-Energie $\left[\frac{J}{mol}\right]$

E_δ : Nicht-Planaritätsenergie $\left[\frac{J}{mol}\right]$

E_ε : Coulomb-Energie $\left[\frac{J}{mol}\right]$

E_{hb} : Wasserstoffbrückenenergie $\left[\frac{J}{mol}\right]$

Der Berechnung der einzelnen Energietermen liegen einfache physikalische Formeln zu Grunde, die mit empirischen Konstanten an experimentelle Werte angepasst werden müssen. Die empirischen Konstanten können hierbei nicht als Einzelkomponenten betrachtet werden, sondern müssen im Gesamtzusammenhang mit allen strukturbestimmenden Berechnungen gesehen werden und ihre Summe wird als Kraftfeld bezeichnet. Da diese meist für eine spezielle Fragestellung entwickelt werden, ist das Kraftfeld sorgfältig für unterschiedliche Probleme zu wählen. Beispiele hierfür sind, dass nicht jedes Kraftfeld die d-Elektronen von Übergangsmetallen berücksichtigt und die problematische Darstellung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen, da Kohlenhydrate wenige unterschiedliche funktionelle Gruppen besitzen und die Verknüpfung der Monomere eine Rolle spielen kann [92, 93].

Die Bindungslängendeformationsenergie E_b kann aus dem Hooke'schen Gesetzes (**Formel 5-2**) abgeleitet werden [92].

$$E_b = \frac{1}{2} * k_b (r_{ij} - r_o)^2$$

Formel 5-2

E_b : Bindungslängendeformationsenergie $\left[\frac{J}{mol}\right]$

k_b : Kraftkonstante für chemische Bindung $\left[\frac{N}{mol*m}\right]$

r_{ij} : Distanz zwischen den Atomen i und j [m]

r_o : Ideale Distanz zwischen den Atomen i und j [m]

Dieser Umstand untersagt eine beliebig starke Stauchung der Bindungen, da die abstoßende Kraft zwischen den beiden Atomkernen mit abnehmender Distanz quadratisch zunimmt [92]. Auch das sich voneinander Entfernen der verbundenen Atome ist nur bis zu einem bestimmten Grad möglich, da Bindungsbrüche mit dieser Betrachtung der chemischen Bindung nicht vorgesehen sind.

Die verwendete Kraftkonstante k_b stellt die Bindungsstärke dar und muss für jede Art von chemischer Bindung empirisch ermittelt werden.

Ähnlich werden Bindungswinkel behandelt (**Formel 5-3**). Hierbei geht man von einer Kraft aus, die, im Gegensatz zur chemischen Bindung, nur Anteile in y- und z-Richtung besitzen [92].

$$E_{\theta} = \frac{1}{2} * k_{\theta} (\theta_{ijk} - \theta_o)^2$$

Formel 5-3

E_{θ} : Bindungswinkeldeformationsenergie $\left[\frac{J}{mol}\right]$

k_{θ} : Kraftkonstante für Bindungswinkeldeformation $\left[\frac{J}{mol * rad^2}\right]$

θ_{ijk} : Bindungswinkel zwischen den Atomen i, j und k $[rad]$

θ_o : Idealer Bindungswinkel zwischen den Atomen i, j und k $[rad]$

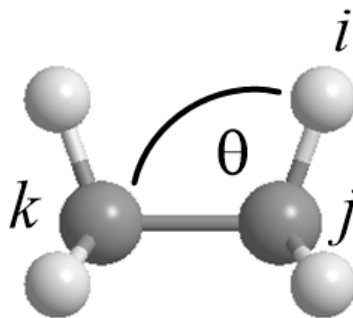


Abbildung 20 Schematische Darstellung des Winkels θ zwischen den Atomen i, j und k .

Die Torsionsenergie eines Moleküls, also die Abweichung vom optimalen Torsionswinkel, kann nicht analog berechnet werden, da die Bindungen, aufgrund von Wechselwirkungen ihrer Substituenten, nicht frei drehbar sind. Es muss zunächst eine Energiebarriere überwunden werden, die Rotationsbarriere k_{ϕ} . Die zugrunde liegende Gleichung (**Formel 5-4**) enthält auch den Koeffizient m , dieser gibt die Periodizität der Drehung um die Bindung an, d.h., er gibt Häufigkeit an, mit der man eine bestimmte Konformation der Substituenten bei einer Drehung um 360° erhält [92].

$$E_{\phi} = \frac{1}{2} * k_{\phi} \left(1 + \cos \left(m * (\phi_{ijkl} + \phi_{Phasenverschiebung}) \right) \right)$$

Formel 5-4

E_{ϕ} : Torsionswinkelenergie $\left[\frac{J}{mol}\right]$

k_{ϕ} : Barriereenergie zur Drehung um den Torsionswinkel $\left[\frac{J}{mol}\right]$

m : Periodizität

ϕ_{ijkl} : Torsionswinkel zwischen den Atomen i, j, k und l $[rad]$

$\phi_{Phasenverschiebung}$: Phasenverschiebung des Energieminimums des Torsionswinkels von der gestaffelten Konformation $[rad]$

Die Aufspaltung der Bindungseffekte in Bindungslängendeformations-, Bindungswinkeldeformations- und Torsionswinkelenergie ist eine Vereinfachung der Berechnung, dieser liegt die Annahme zugrunde, dass diese Energien nur sehr schwach miteinander interagieren. Tatsächlich sind die Bindungslängen von Substituenten am selben Atom, aufgrund der Abstoßung der Atome, nicht unabhängig von ihrem Bindungswinkel.

Je kleiner der Winkel zwischen den Substituenten ist, desto länger sind die Bindungen, daher wird der korrigierende Term für $E_{b\theta}$ in die Verzerrungsenergiegleichung eingefügt [92].

Der Nicht-Planaritätsenergieterm findet, in den meisten Kraftfeldern, nur Anwendung für sp^2 -hybridisierte Atome, wie z.B. die Kohlenstoffatome in C=C-Doppelbindungen und den Kohlenstoffatomen in Carboxyl- und Amidfunktionen oder aromatischen Systemen, kann aber auch zu einer Verbesserung der berechneten Energien bei der Geometrieberechnung von quadratisch-planaren Komplexen und Kohlenhydraten führen. Hierbei bilden die drei Atomkerne A, B und C eine Ebene und die Lage des Atomkerns D zur Ebene wird mit dem Winkel ψ oder der Höhe über der Ebene h beschrieben (**Abbildung 21**) [92, 94]. Dabei wird der ψ bzw. h mit dem experimentell bestimmten Wert im Gleichgewicht verglichen (je kleiner die Abweichung desto geringer der Energieterm).

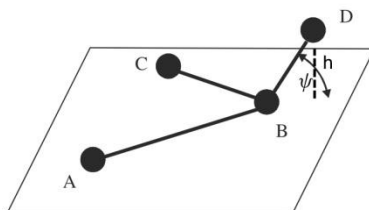


Abbildung 21 Schematische Darstellung der Nicht-Planarität modifiziert nach Hincliffe. [94] Die Atome A, B und C bilden hierbei eine Ebene. h bezeichnet die Höhe des Atoms D über dieser Ebene. ψ beschreibt den Winkel zwischen D, B und der Ebene.

Der Van-der-Waals-Energieterm fasst mehrere Wechselwirkungen zusammen. Er besteht nicht nur aus der anziehend wirkenden London-Kraft, sondern beinhaltet auch Wechselwirkungen zwischen permanenten, elektrischen Dipolen bzw. permanenten und kurzlebige Multipolen sowie ein Term, der eine Unterschreitung eines optimalen Abstandes mit einer Erhöhung der gesamten Van-der-Waals-Energie bestraft.

Die verschiedenen Ansätze zur Berechnung der Van-der-Waals-Energie unterscheiden sich nur hinsichtlich ihrer Behandlung der repulsiven Kräfte. Hierbei sind die Potentiale nach Morse, Lennard-Jones, Buckingham und Hill sowie eine Kombination aus Lennard-Jones- und Buckingham-Potential zu unterscheiden [89, 92, 95, 96].

Das Lennard-Jones Potential wird häufig eingesetzt um nicht bindende Interaktionen zu berechnen, da die Berechnung weniger zeitaufwendig ist, im Vergleich zu den Potentialen nach Buckingham und Hill, aber die Wechselwirkungen besser beschreibt als das Morse-Potential [89, 92]. Das Energieminimum für Van-der-Waals-Wechselwirkungen wird bei der Distanz d^0 erreicht, die der Summe der Van-der-Waals-Radien der beiden betrachteten Atome entspricht (**Abbildung 22**).

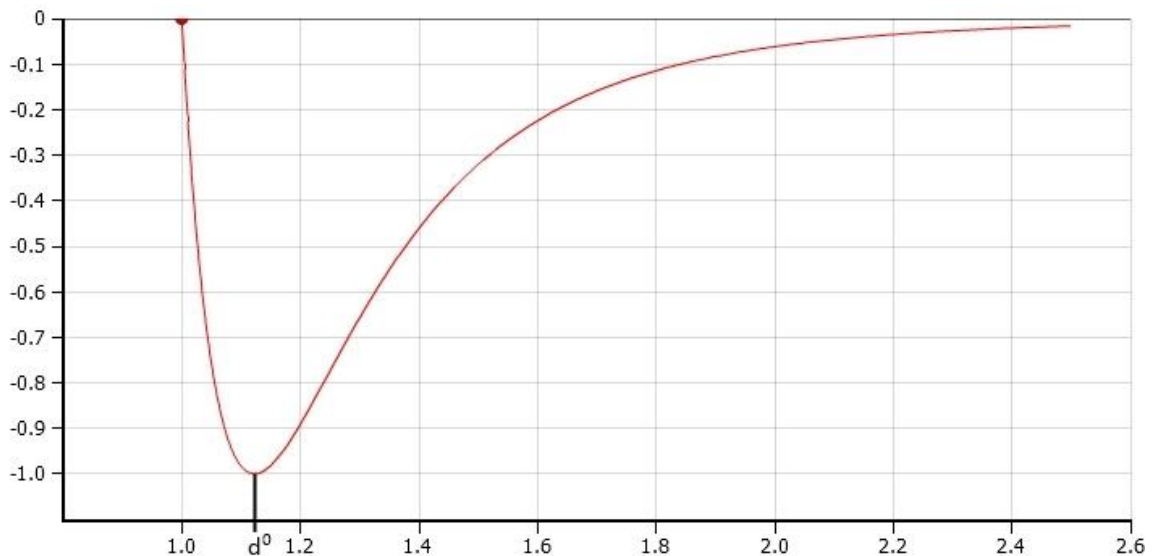


Abbildung 22 Beispiel für ein Lennard-Jones-Potential-Diagramm mit der minimalen Distanz zwischen zwei Atomen d^0 . Modifiziert nach SaECanet.com. [97]

Der Anteil der Coulomb-Energie an der gesamten Verzerrungsenergie kann einfach durch das Coulomb-Gesetz beschrieben werden und ist daher nicht nur abhängig von dem Betrag der Ladung der beiden Teilchen q_i und q_j , sondern auch von ihrem Vorzeichen. Da gleichgeladene Teilchen sich abstoßen nimmt die Coulomb-Energie in diesem Fall mit zunehmender Distanz d_{ij} ab. Bei gegensätzlich geladenen Teilchen ist ein gegenläufiger Effekt zu beobachten [89, 92, 96].

$$E_{\varepsilon} = \frac{q_i * q_j}{\varepsilon_0 * d_{ij}}$$

Formel 5-5

E_{ε} : Coulomb-Energieterm $\left[\frac{J}{mol} \right]$

q_i : Ladung des Atoms i [C]

q_j : Ladung des Atoms j [C]

d_{ij} : Abstand zwischen den Atomen i und j [m]

ε_0 : Dielektrizitätskonstante $\left[\frac{As}{m*V} \right]$

Manche Kraftfelder besitzen zusätzliche Erweiterungen dieses Gesetzes um Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Polarisierbarkeit von Atomen zu berücksichtigen. Hierbei kann die Polarisierbarkeit von Atomen durch eine Induktion des Dipolmomentes oder durch ein fluktuierendes Ladungsmodell, wie z.B. das „Ladung an einer Springfeder“-Modell oder auch durch den Drude-Oszillator beschrieben werden.

Diese Kraftfelder werden als polarisierbare oder nicht-additive Kraftfelder bezeichnet.

Die Polarisierbarkeit α ist hierbei vom Atomtyp abhängig. Die Position der Ladung am Atom kann je nach Änderung des äußeren Feldes variieren und wird mit Hilfe der Ladung q_D sowie deren Federkonstante k beschrieben (**Formel 5-6**) [92].

$$\alpha = \frac{q_D^2}{k}$$

Formel 5-6

α : Polarisierbarkeit $\left[\frac{C \cdot m^2}{V}\right]$

q_D : Ladung des Atoms $[C]$

k : Kraftkonstante $\left[\frac{C \cdot V}{m^2}\right]$

Energiewerte für Wasserstoffbrückenbindungen werden in vielen Kraftfelder implizit berechnet, gehen also in den Van-der-Waals- und Coulomb-Energieterm ein.

Kraftfelder, die Wasserstoffbrückenbindungsenergieterme besitzen legen diesem einen Lennard-Jones-Potential-ähnlichen Term zugrunde. Bei diesem Term werden die Parameter so gewählt, dass die Energie des anziehenden Anteils mit zunehmender Distanz stärker abnimmt.

Die einzelnen Energieterm zeigen, dass ein molekülmechanisches Rechenmodell zwar Wechselwirkungen innerhalb eines Moleküls und zwischen Molekülen beschreiben kann aber die elektronenabhängigen Eigenschaften, wie z. B. die Reaktivität oder spektroskopische Eigenschaften nicht berücksichtigt. In einigen Kraftfeldern werden zwar die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, die selbst zu den elektronischen Eigenschaften gehören, modelliert aber die Präzision liegt weit unter den durch quantenmechanische Berechnungen erreichten Werten.

Nichtsdestotrotz bilden diese Berechnungen die Grundlage für die schnelle Geometrieoptimierung von Makromolekülen und moleküldynamische Simulationen von Biomolekülen und anderen Polymeren [89, 90, 94, 98].

Die Energieoptimierung erfolgt bei allen Methoden durch eine iterative Annäherung an das der Ausgangsstruktur am nächsten liegende Minimum. Um mit möglichst geringem Zeitaufwand ein akzeptables Ergebnis zu erreichen, spielt die richtige Wahl des Iterationsverfahrens eine entscheidende Rolle. Wird das Verfahren des steilsten Abstiegs („steepest descent“) gewählt, konvergiert die Berechnung nur langsam gegen das Minimum, da sich die Struktur dem Ergebnis auf einem Zick-Zack-Kurs annähert. Diese Methode bietet nur Vorteile wenn die zu optimierende Struktur weit vom Minimum entfernt ist [99].

Deutliche Zeitersparnisse lassen sich mit den Verfahren der konjugierten Gradienten, wie z. B. dem Fletcher-Reeves- oder dem Polak-Ribiere-Algorithmus, erreichen. Bei diesen Verfahren wird der Gradient des vorausgegangenen Iterationsschritts mitberücksichtigt.

5.2.2. Physikalische Grundlagen und Einsatzgebiete von *ab-initio*-Methoden

Ab-initio-Berechnungen werden, bei der Modellierung von Makromolekülen, nur unter großen Einschränkungen eingesetzt, da der Informationsgewinn meist in keinem Verhältnis zum Rechenaufwand steht. Es bietet sich daher an, die *ab-initio*-Berechnungen nur auf Teile eines Makromoleküls, wie z.B. die Bindungstasche eines Enzyms oder die Antigenbindungsstelle eines Antikörpers, anzuwenden.

Die nicht mit Hilfe von *ab-initio*-Methoden berechneten Teile des Makromoleküls werden hierbei molekülmechanisch optimiert. Dieser Ansatz wird in der Literatur als kombinierte QM/MM-Methode

bezeichnet [92, 100]. Besonders kritisch ist hierbei der Grenzbereich zwischen den beiden Methoden zu betrachten, die Bereiche können Bindungen teilen oder Atome besitzen, die von beiden Bereichen beschrieben werden und daher besondere Eigenschaften besitzen [100]. Der erhöhte Rechenaufwand lässt sich einfach an Hand der zugrunde liegenden physikalischen Gesetzmäßigkeiten erklären.

Da de Broglie für Teilchen auch Welleneigenschaften postuliert und diese Eigenschaften mit abnehmender Masse zunehmen, gilt dies auch für Atomkerne sowie die sie umgebenden Elektronen. Diese werden daher mit Hilfe der zeitunabhängigen Schrödinger-Gleichung beschrieben (**Formel 5-7**) [92, 101, 102].

$$\hat{H}\Psi(\vec{r}) = \left(-\frac{\hbar^2}{2m}\Delta + U(\vec{r}) \right) \Psi(\vec{r}) = E \Psi(\vec{r})$$

Formel 5-7

- \hat{H} : Hamilton-Operator
- Ψ : Wellenfunktion Ψ
- \vec{r} : Ortsvektor
- \hbar : reduziertes Planck'sches Wirkungsquantum [$N * m * s$]
- m : Masse [g]
- Δ : Laplace-Operator
- U : potentielle Energie [J]
- E : Energieeigenwertmatrix E [J]

Der Hamilton-Operator \hat{H} spielt in der Quantenmechanik eine zentrale Rolle, angewandt auf eine Wellenfunktion erzeugt er weitere Wellenfunktionen, die in der Energieeigenwertmatrix E zusammengefasst werden.

Die Gesamtenergie umfasst neben der kinetischen Energie der Teilchen des Systems, in der Formel 5-15 repräsentiert durch $-\frac{\hbar^2}{2m}\Delta$ bzw. $-\frac{\hbar^2}{2m}\Delta \psi(\vec{r})$, die potentielle Energie durch Wechselwirkungen zwischen mehreren Teilchen desselben Systems und die potentielle Energie, die auf äußere Potentiale zurückzuführen ist ($U(\vec{r})$ bzw. $U(\vec{r})\psi(\vec{r})$) [102].

Die Wellenfunktion Ψ beschreibt hingegen den quantenmechanischen Zustand des Systems und ist ortsabhängig [102].

Die Energieeigenwertmatrix E der Wellenfunktion Ψ beschreibt die erlaubten, diskreten Energiewerte, die das beschriebene System annehmen kann. Die Energieeigenwert-differentialgleichungen können, je nach Wahl weiterer Randbedingungen, die vom betrachteten Problem abhängig sind, eine Schar orthogonaler Differentialgleichungen oder diskrete Energiewerte ergeben. Die Differentialgleichungen entsprechen hierbei den Energieniveaus des Systems, die von Elektronen besiedelt werden können. Die Orthogonalität der Energieniveaus zeigt, dass sie unabhängig voneinander sind und Elektronen nur bestimmte Energiewerte in diesem System annehmen können, d.h. die Energieniveaus sind quantisiert [102].

Ein weiteres Problem bei der Berechnung ist, dass für Elementarteilchen die Heisenberg'sche Unschärferelation gilt [103]. Aus diesem Ansatz geht hervor, dass zwei komplementäre Eigenschaften eines Teilchens nicht beliebig genau, zur selben Zeit, bestimmt werden können. Das bekannteste Beispiel hierfür ist die Bestimmung von Impuls und Aufenthaltsort eines Elementarteilchens. Sie sind im Gegensatz zur klassischen Mechanik in der Quantenmechanik nicht unabhängig voneinander und ergeben sich beide aus derselben Wellenfunktion. Daher wird der Impuls der Teilchen möglichst genau bestimmt und die Aufenthaltswahrscheinlichkeit, in einem bestimmten Raum, eines Teilchens mit Hilfe der Wahrscheinlichkeitsdichte beschrieben bzw. mit dem Betragsquadrat der Wellenfunktion bestimmt. Weitere Schwierigkeiten bereiten Mehrteilchensysteme, da alle Teilchen über einen eigenen Impuls verfügen und miteinander aufgrund von Coulomb-Kräften wechselwirken. Diese Systeme sind nur für den einfachsten Fall, das Wasserstoffatom, eindeutig lösbar. Für komplexere Systeme wird die Born-Oppenheimer-Approximation verwendet.

Hierbei wird, aufgrund der großen Massenunterschiede der Kerne und Elektronen, die kinetische Energie der Kerne zunächst vernachlässigt und somit der Aufenthaltsort der Kerne als konstant behandelt. Hierdurch kann die Schrödinger-Gleichung für die Elektronen gelöst werden. Die Kerne hingegen werden von der Eigenbewegung der Elektronen nicht beeinflusst, stattdessen wirken die Eigenenergien der Elektronen auf die Atomkerne ein. Die quantisierten Energieniveaus bilden dabei Potentiale, in denen sich die Kerne bewegen [104].

Neben dem bereits erwähnten Impulsparameter sind für die Lösung der meisten Probleme noch weitere Parameter nötig, die in den Quantenzahlen zusammengefasst sind. Die Hauptquantenzahl n gibt hierbei das Energieniveau des Teilchens, die Drehimpulsquantenzahl l den Drehimpuls, die Magnetquantenzahl m die z-Achsenkomponente des Bahndrehimpulses und die Spinquantenzahl s , die Orientierung des Eigenspins in z-Richtung an [102].

Die Anzahl der Abhängigkeiten der Schrödinger-Gleichung macht das Lösen zu einem rechenzeitaufwändigen Unterfangen. Um diesen Aufwand zu minimieren werden häufig Annahmen und Annäherungen verwendet wie sie in Berechnung mittels der Hatree-Fock-Methode zu finden sind.

5.2.2.1. Die Hatree-Fock-Approximation

Die Hatree-Fock-Approximation (HF-Approximation) bildet die Basis für fast alle konventionellen wellenfunktionbasierenden computerchemischen Methoden [105].

Sie nimmt sich dem Fall der *ab-initio*-Berechnung von Molekülen mit komplexeren Molekülorbitalen (MOs) an. Diese können, aufgrund der Vielzahl an Elektronen, nicht ausreichend durch eine Wellenfunktion mathematisch beschrieben werden. Die hohe Anzahl an Elektronen führt zu einer Vielzahl von Termen zur Beschreibung der Abstoßung zwischen jedem möglichen Paar von Elektronen und dies ist nicht das einzige Problem das hierbei auftritt. Die Abstoßung führt weiterhin zu einer Korrelation der Bewegung der Elektronen, da eine Minimierung der abstoßenden Coulomb-Kräfte eine Minimierung der Gesamtenergie des Systems zur Folge hat. Mit der Korrelation der Elektronenbewegung ergibt sich des Weiteren das Problem eine Wellenfunktion zu finden, welche das Gesamtsystem ausreichend genau beschreibt.

Um dieses Problem zu umgehen werden häufig die Elektronen als unabhängige Teilchen betrachtet. Dies führt zu einer drastischen Vereinfachung der Berechnung, da nun jedes Elektron mit seiner eigenen Wellenfunktion beschrieben werden kann [90, 102]. Aufgrund ihrer fermionischen Eigenschaft, nicht voneinander unterscheidbar zu sein, können nicht die Wellenfunktionen selbst zu den Berechnungen

eingesetzt werden, sondern ihr antisymmetrisches Produkt. Diese Produkte werden in einer Matrix der sogenannten Slater-Determinante zusammengefasst (**Formel 5-8**) [90, 92, 94, 105].

$$\Psi_0 \approx \Phi_{SD} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{bmatrix} \chi_1(\vec{X}_1) & \cdots & \chi_N(\vec{X}_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_1(\vec{X}_N) & \cdots & \chi_N(\vec{X}_N) \end{bmatrix}$$

Formel 5-8

Ψ_0 : Wellenfunktion des gesamten Moleküls

Φ_{SD} : Slater-Determinante

N : Nummer des Elektrons bzw. der Wellenfunktion

$\chi_N(\vec{X}_N)$: Spin-Orbital des Elektrons N (Produkt aus dem Teilorbital Φ_N und einer der beiden orthonormalen Spin-Funktionen α oder β)

Da die einzige variable Komponente der Slater-Determinante die Spin-Orbitale sind, müssen diese so angepasst werden, dass die Gesamtenergie der Wellenfunktion des Moleküls möglichst klein ist und die Orthogonalität der Orbitale erhalten bleibt. Dies geschieht iterativ [105].

Die erwarteten Energiewerte können durch die Anwendung des Hamilton-Operators auf die Slater-Determinante berechnet werden.

Die Korrelationen der Elektron-Elektron-Abstoßung werden hierbei vereinfacht behandelt. Anstatt das Potential für jedes Paar von Elektronen einzeln zu berechnen, erfährt jedes Elektron die Abstoßung durch das gemittelte Potential der anderen Elektronen und Atomkernen [90]. Dies geschieht aufgrund der Born'schen Regel, die besagt, dass das Quadrat einer Wellenfunktion die Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Teilchens in einem Raum darstellt. Somit können die anderen Elektronen in Form einer Ladungsverteilung in dem beschriebenen Raum berücksichtigt werden. Da aufgrund des Pauli-Verbotes die Elektronen eines MOs sich auch mindestens in einer Quantenzahl unterscheiden müssen, werden sich bei der Berechnung der Wellenfunktion die antisymmetrischen Eigenschaften von Fermion-Wellenfunktionen zu Nutze gemacht.

Durch die Antisymmetrie kann die MO-Wellenfunktion in einzelne Atomorbital(AO)-Wellenfunktionen aufgespalten werden und Abhängigkeiten der Elektronen unterschiedlicher AO mittels Zwei-Elektronenoperator beschrieben werden. Der Operator lässt sich, durch das Wegfallen der Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den AOs weiter vereinfachen [90].

Auch die Beschreibung der einzelnen AOs, die der Berechnung des MO zugrunde liegen, kann auf unterschiedlicher Weise geschehen. Zu diesem Zweck dienen die sogenannten Basissätze. Sie enthalten eine möglichst große Anzahl von Funktionen zur Beschreibung von AOs um mit ihrer Hilfe, über Linearkombinationen, das MO genau zu beschreiben. Es ist aber hierbei zu beachten, dass aufgrund dieser Annahmen die Gesamtenergie des Systems im besten Fall annähernd gleich, in der Regel aber höher als der tatsächliche Wert ist [90]. Die Energiedifferenz zwischen dem tatsächlichen Energiewert und dem berechneten Wert wird Korrelationsenergie genannt und ist ein Maß für den Fehler, der durch die HF-Methode eingeführt wurde. Die präzise und effektive Bestimmung der beitragenden Elemente ist noch Gegenstand der Forschung, aber es ist bekannt, dass die Abstoßung der Elektronen einen großen Teil dazu beiträgt. Dies lässt sich einfach durch die Wechselwirkung

zwischen einem Elektron und dem gemittelten Wert der anderen erklären, hierbei kommt es zu einer zu häufigen Abstoßung zwischen den Elektronen [105].

5.2.2.3. Die Dichtefunktionaltheorie

Die Dichtefunktionaltheorie (DFT) ist ein weiterer häufig verwendeter Ansatz zum Modellieren von Molekülen. Sie wird meist für Übergangsmetallkomplexe eingesetzt und kann für genauere Berechnungen von großen Molekülen, wie z.B. Biomoleküle u. a. Makromoleküle verwendet werden [90, 92].

Sie beschreibt die MOs eines Moleküls durch die Elektronendichte, genauer gesagt durch die Aufenthaltswahrscheinlichkeitsdichte der Elektronen im Raum. Ein entscheidender Unterschied zu den in den *ab-initio*-Methoden verwendeten Wellenfunktionen ist, dass die Elektronendichte eine messbare Größe ist. Sie kann z.B. mit Hilfe von Röntgenbeugungsexperimenten bestimmt werden. Die modernen DFT-Methoden beruhen auf den Tatsachen, dass die Eigenschaften des elektronischen Grundzustands eines Moleküls Funktionale (eine Funktion einer Funktion) der Elektronendichte sind [90, 105].

Ein Beispiel hierfür ist die Gesamtenergie des Grundzustands. Diese Energie hat ihr Minimum an dem Punkt, an dem das Funktional exakt der Elektronendichte des Grundzustands entspricht. Allerdings konnten Hohenberg und Kohn beweisen, dass es dieses Funktional zwar gibt, aber eine Methode um den zugrunde liegenden Grundzustand genau abzubilden wurde bisher noch nicht gefunden [90, 106]. Daher ist es notwendig mit Annäherungen zur Behandlung der kinetischen Energie, Austausch- und Korrelationsenergien zu arbeiten. Ein weiterer Aspekt ist die Abhängigkeit der Elektronendichte von der Lage der Atomkerne des Moleküls. Legt man die Born-Oppenheimer-Approximation zu Grunde, so ist die Elektronendichte eines Systems das Ergebnis der Position der Atomkerne und somit kann die Position der Atomkerne bestimmt werden [90].

Die meist verbreitete DFT-Methode ist die Methode nach Kohn und Sham. Diese Methode kombiniert den Elektronendichteansatz mit Wellenfunktionen (**Formel 5-9**) [90, 94, 105, 107].

$$E[\rho] = T_0[\rho] + \int [\hat{V}_{ext}(r) + \hat{U}_{el}(r)]\rho(r)dr + E_{xc}[\rho]$$

Formel 5-9

ρ : Elektronendichte $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3}\right]$

$E[\rho]$: Funktional der Gesamtenergie des Moleküls in Abhängigkeit der Elektronendichte ρ $\left[\frac{\text{Nm}}{\text{mol}}\right]$

$T_0[\rho]$: Funktional der kinetische Energie von Elektronen eines Systems, das dieselbe Elektronendichte hat wie das zu beschreibenden System (ohne Elektron-Elektron-Wechselwirkungen) $\left[\frac{\text{Nm}}{\text{mol}}\right]$

$\hat{V}_{ext}(r)$: Externes Potential im Raum r $\left[\frac{\text{C}}{\text{m}}\right]$

$\hat{U}_{el}(r)$: Coulomb-Potential zwischen Elektronen im Raum r $\left[\frac{\text{C}}{\text{m}}\right]$

$E_{xc}[\rho]$: Funktional der Austausch-Korrelationsenergie der Elektronendichte ρ $\left[\frac{\text{Nm}}{\text{mol}}\right]$

Hierbei enthält das Funktional der Austausch-Korrelationsenergie alle Energien, die in den anderen Termen nicht berücksichtigt werden, wie z.B. Elektronenkorrelation zwischen nicht interagierenden Elektronen, eine Energiekorrektur für Selbstinteraktion durch Anwendung des klassischen Coulomb-Potentials und ein Energieterm um die kinetische Energie von $T_0[\rho]$ in Hinblick auf den wahren Wert der kinetischen Energie zu korrigieren [90].

Das exakte Austausch-Korrelationsenergie-Funktional ist nicht bekannt, kann aber angenähert werden. Da aber die Qualität der Ergebnisse stark von der Wahl der Parameter der verwendeten Funktionale abhängt, werden viele unterschiedliche DFT-Methoden verwendet, wie z.B. SVWN5, BLYPPW91 sowie PBE0 und viele mehr [90].

5.2.2.3. Semi-empirische Methoden

Semi-empirische Methoden können als einfachster Kompromiss zwischen den genauen *ab-initio*-Berechnungen und den schnellen molekülmechanischen Methoden aufgefasst werden [90, 92, 100]. Sie basieren auf modifizierten HF-Berechnungen. Hierbei werden bestimmte quantenmechanische Effekte, deren Berechnung zeitaufwändig ist, nicht beachtet oder durch parametrisierte Terme ersetzt. Dabei basieren semi-empirische Methoden auf 3 Näherungen.

Die erste Näherung vernachlässigt die kernnahen Elektronen. Da sie nicht zu der chemischen Aktivität beitragen, werden sie für die Berechnungen mit dem Atomkern zusammengefasst und tauchen in der Berechnung als parametrisierter Term auf.

Die zweite Näherung betrifft die Anzahl der Basissätze. Da nur die Valenzelektronen betrachtet werden, wird die Anzahl der Basissätze stark reduziert und dadurch die Komplexität der Berechnung verringert. Die dritte Approximation betrifft die Zwei-Elektronenintegrale. Diese werden, je nach gewählter Methode, entweder vollständig ignoriert (CNDO), nur zwischen zwei Atomen ignoriert (NDDO) und bei der dritten Variante durch eine modifizierte Zwischenlösung (INDO) behandelt [92]. Die Vernachlässigung der Zwei-Elektronenintegrale wird durch ein Anpassen der berechneten Werte an experimentell bestimmte Eigenschaften (z.B. Bildungsenthalpie, geometrische Variabilität, Dipolmomente, Ionisierungsenergien für das Entfernen des ersten Elektrons) verschiedener Klassen von Stoffen kompensiert [90]. Neben den genannten Vorteilen dieser Methoden ist noch zu erwähnen, dass die Parametrisierung semi-empirischer Methoden anhand einer Datenbank von Molekülen erfolgt. Daher liefern diese Methoden gute Ergebnisse, wenn das zu modellierende Molekül den Einträgen in diesen Datenbanken möglichst ähnlich ist. Dementsprechend kann ein Modell eines signifikant unterschiedlichen Moleküls auch sehr schlechte Ergebnisse liefern und somit die Eigenschaften des Moleküls nicht richtig widerspiegeln [90].

Ein Beispiel für eine verwendete semi-empirische Methode ist die „Parametric Method 3“ (PM3). Diese Methode kann, durch eine sehr große Anzahl von auf molekülberuhenden Daten und eine verbesserte Behandlung der Kern-Kern-Abstoßung, die Wasserstoffbindungen eines Moleküls sehr genau beschreiben. Allerdings wird die Anziehung zwischen Wasserstoffkernen stark überinterpretiert. Dies führt zu falschen Ergebnissen bei der Analyse von intermolekularen Wechselwirkungen und intramolekularen Wechselwirkungen innerhalb sehr flexibler Moleküle. In der Literatur wird u.a. beschrieben, dass bei Berechnungen von Methan, dieses als stark gebundenes Dimer vorliegen sollte anstatt in Form von Monomeren [90].

PM7, ein Nachfolger der beschriebenen PM3-Methode, bietet für das Modellieren von Peptiden und kleinen Proteinen eine molekülmechanische Korrektur der Rotationsbarriere um die Peptidbindung,

welche hinsichtlich des Peptidrückgrats zu einer besseren Übereinstimmung der berechneten mit den experimentellen Ergebnissen führt [108, 109].

5.3. Moleküldynamische Simulationen

Die bisher vorgestellten Methoden zur Informationsgewinnung im Bereich der Computerchemie geben zwar Aufschluss über wichtige Aspekte von modellierten Molekülen, diese sind aber nicht vollständig. Sie geben keinerlei Aufschluss auf die zeitabhängige Veränderung von Verbindungen, wie z. B. Bindungslängen und -winkel. Auch werden Wechselwirkungen mit dem umgebenden System völlig ignoriert. Dies ist auch verständlich, da der Rechenaufwand bei den quantenmechanischen Methoden bereits für ein Molekül ohne zeitliche Auflösung der Molekülschwingungen und ohne Wechselwirkungspartner hoch ist. Daher benötigt man einfachere Methoden um die Zeitabhängigkeit von Wechselwirkungen und intramolekulare Oszillationen zu simulieren. Hier bieten sich molekülmechanische Kraftfelder an, da sie, mathematisch betrachtet, ein einfaches System darstellen.

5.3.1. Prinzipien der Moleküldynamischen Simulation

MD-Simulationen basieren auf dem Lösen der Newton'schen Bewegungsgleichung für interagierende Atome eines Systems [89]. Hierbei wird nicht nur die Position der Atome, sondern auch die Kraft, die als Beschleunigung wirkt, also (durch ihre Ableitung) die Geschwindigkeit der Atome berechnet. Da sich die Geschwindigkeit und die Position der Atome im Zeitintervall Δt ändern, kann die Position und die Geschwindigkeit des Atoms im nächsten Zeitschritt ($\Delta t + 1$) nur indirekt berechnet werden. Hierfür wird im Normalfall der sogenannte „Leap-frog“-Integrator verwendet [89, 94]. Bei dieser Integrationsmethode werden die Positionen der Atome zum Zeitpunkt t bzw. $t + \Delta t$ berechnet und die Geschwindigkeit, mittels der Kraft $F(t)$, zum Zeitpunkt $t + \frac{1}{2} \Delta t$ berechnet (**Abbildung 23**). Diese Geschwindigkeit wird verwendet um die Positionen zum Zeitpunkt $t + 2 \Delta t$ zu bestimmen.

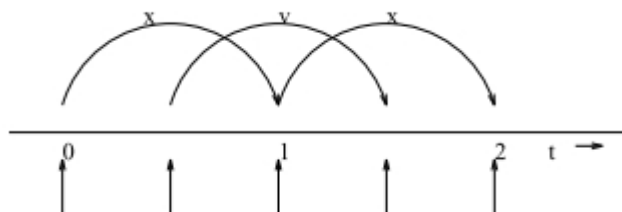


Abbildung 23 Schematische Darstellung des „Froschsprungs“ der Koordinaten x und der Geschwindigkeit v übereinander nach Abraham *et al.* für $x = 0, 1, 2$ und $v = 0,5$ und $1,5$ [89].

Die Eignung des Algorithmus für eine präzise Bestimmung der Position bei gleichzeitiger Betrachtung einer Temperatur- und/oder Druckänderung ist fragwürdig [89, 94]. Hierfür eignet sich der „Velocity-Verlet“-Algorithmus.

Der Velocity-Verlet-Algorithmus benötigt nicht die interpolierte Geschwindigkeit aus den Zeithalbschritten, sondern ausschließlich die Position r und Geschwindigkeit v der Atome zum Zeitpunkt t . Verwendet man keine Temperatur- oder Druckkopplung, ergeben die zugrunde liegenden Gleichungen, bei vergleichbaren Ausgangspunkten, die gleichen Ergebnisse für Position und Geschwindigkeit der Atome [89, 96, 98].

5.3.2. Charakteristika eines simulierten Systems

Die Definition des simulierten Systems ist eine wichtige Voraussetzung für die darauffolgenden Berechnungen, da bereits beim Erstellen des Modells, die Eigenschaften entscheiden wie effektiv das System beschrieben werden kann und wie präzise das Modell die physikalischen Eigenschaften beschreibt.

Der erste Schritt der Definition des simulierten Systems ist die Beschreibung des betrachteten Volumens. Hierbei ist zu beachten, dass das System geschlossen sein muss um es ausreichend mathematisch beschreiben zu können. Diese geschlossenen Systeme werden auch Elementarzelle genannt. In der Regel wird versucht das Volumen möglichst klein zu halten um Rechenzeit einzusparen. Um Grenzeffekte an den Außenflächen der Elementarzelle zu reduzieren, wird nicht eine isolierte Elementarzelle berechnet, sondern eine Zelle, die mit translatierten Abbildern ihrer selbst umgeben ist. Dieser Zustand wird „periodic boundary condition“ genannt [89, 96]. Aufgrund dieser Konditionen ist man bei der Minimierung des Volumens der Elementarzelle eingeschränkt, da bei einem zu geringen Abstand des Zielmoleküls zur Grenzfläche dieses mittels Van-der-Waals- und Coulomb-Kräften mit seinen Spiegelbildern interagiert.

Auch ist die Form der Elementarzelle entscheidend, ein möglichst kleines Volumen kann mit der richtigen Wahl erreicht werden. Der Idealfall wäre die Kugel. Sie bietet neben dem kleinsten Volumen, aber auch den Nachteil, dass bei einer Translation des Körpers an seinen eigenen Grenzflächen große Lücken zwischen den Spiegelbildern entstehen, die bei den Berechnungen nicht berücksichtigt werden. Der einfachste Fall für eine lückenlose Beschreibung ist der Würfel, der Nachteil hier besteht darin, dass das Volumen verhältnismäßig groß ist. Daher finden häufig andere Formen ihren Weg in die Simulationen, wie z. B. rhombische Dodekaeder und Oktaederstümpfe („truncated octahedron“). Ein weiterer Faktor der die Trajektorie stark beeinflusst ist das Medium. Wird die Simulation im Vakuum durchgeführt, spielt die Wechselwirkung mit anderen Molekülen der Elementarzelle keine Rolle und es müssen nur intramolekulare Interaktionen berücksichtigt werden. Ist das Medium aber eine Flüssigkeit, so wechselwirkt das Zielmolekül auch mit den Mediummolekülen (meist Wassermoleküle). Diese Wechselwirkungen sind auch sehr stark von dem verwendeten Modell abhängig. Einfache Wassermoleküle, wie SPC und SPC/E sowie TIP3P, TIP4P und TIP5P werden daher häufig für MD-Simulationen verwendet.

Während die Abkürzung SPC („simple point charge“) schon verrät, dass das Wassermolekül durch Punktladungen an den einzelnen Atomen beschrieben wird, stehen die Bezeichnungen TIP3P, TIP4P bzw. TIP5P für „transferable intermolecular potential with three [four / five] interaction sites“, wobei die Ladungen auf mehrere Zentren verteilt werden [110].

Die Modelle SPC und TIP3P sind einfachere Modelle, die von drei Interaktionszentren, verteilt auf das Sauerstoffatom und den beiden Wasserstoffatomen des Moleküls, ausgehen und den einzelnen Atomen starre Punktladungen zuordnen. Die intermolekularen Wechselwirkungen werden bei diesen Modellen durch Lennard-Jones- und Coulomb-Potentiale beschrieben [94, 111]. Während viele makroskopische Eigenschaften von Wasser bei Normalbedingung (300 K und 1 atm) mit diesen Modellen gut beschrieben werden können, werden die Selbstdiffusionskonstante und die Dielektrizitätskonstante nur schlecht abgebildet [110].

Das erweiterte Modell SPC/E kann die Dielektrizitätskonstante besser abbilden, da ein Selbstpolarisationsenergiekorrekturterm eingeführt wird. Dadurch werden die Partialladung an dem Sauerstoffatom und die Ladungen an den Wasserstoffatomen erhöht [110].

Nichtsdestotrotz wird in der Literatur beschrieben, dass sich die Modelle SPC und TIP4P am besten eignen um Simulationen mit Biomolekülen durchzuführen. SPC/E liefert hingegen Entropiewerte, die stärker von den experimentellen abweichen und höhere Energien für die Wasserstoffbrückenbindungen ergeben. Dennoch stimmt die durchschnittliche Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen eines Wassermoleküls mit dem Literaturwert von 2,4 überein [111].

Die Rechendauer und -genauigkeit hängt auch von dem verwendeten Rechenmodell für weitreichende Wechselwirkungen, also Kräfte, die über eine große Distanz wirken, ab. Da diese Wechselwirkungen sich seltener ändern und aufgrund der Distanz weniger stark ausgeprägt sind, können die nicht-bindenden Wechselwirkungen (beschrieben durch das Lennard-Jones- und das Coulomb-Potential) in zwei Gruppen unterteilt werden. In nicht-bindende Kräfte, die über eine kurze Distanz wirken und in jedem Iterationsschritt berücksichtigt werden und nicht-bindende Kräfte, die über eine größere Distanz wirken und daher auch nur in jedem n -ten Iterationsschritt berechnet werden und für die nächsten $n-1$ Iterationen verwendet werden, wie z.B. die weitreichenden, elektrostatischen Wechselwirkungen. Der Zahlenwert für n muss vor der MD-Simulation festgelegt werden und liegt in der Regel bei 10 [89]. Somit spielt der Abstand, der als Richtwert für die Unterscheidung zwischen kurzer und großer Distanz verwendet wird („cut-off“), eine entscheidende Rolle und es gibt auch einige Einschränkungen in der Wahl des cut-off-Radius.

Um Wechselwirkungen eines Solventmoleküls oder eines anderen Teilchens in einer Elementarzelle mit zwei Teilen desselben Biomoleküls zu verhindern, sollte die Länge jeder Kante der Elementarzelle so gewählt werden, dass sie die um den zweifachen cut-off-Radius vergrößerte Länge des Biomoleküls übersteigt [89].

5.3.3. Vorbereitung der Simulation

Vor jeder MD-Simulation sind noch einige vorbereitende Schritte zu beschreiten. Der wichtigste Schritt ist eine Energieminimierung des Systems, da viele in ein neues System eingeführte Strukturen weit von ihrem globalen oder gar von jeglichem lokalen Minimum entfernt sind. Dies kann durch die Anwesenheit eines Lösungsmittels oder durch Unterschiede in den Kraftfeldern, die zur Modellierung und Simulation verwendet werden, begründet sein. Die ohne vorherige Minimierung gewonnenen Resultate können somit fehlerbehaftet sein, da eine Minimierung während der Simulation auftritt [89]. Als weiterer Punkt ist anzuführen, dass bei den im Vakuum (Modellierung) und Lösungsmittel durchgeführten Minimierungen Temperatur und Druck unberücksichtigt geblieben sind, d.h. die Minimierungen wurden am absoluten Nullpunkt durchgeführt [94]. Um plausible Ergebnisse für den simulierten Zeitraum zu erhalten, ist nun eine Äquilibration des Systems an Normalbedingungen (300 K, 1013 atm) notwendig. Diese Äquilibration kann mit Hilfe eines kanonischen Ensembles (NVT) durch Simulation über einen bestimmten Zeitraum erreicht werden.

Ein kanonisches Ensemble ist ein System, das aus zwei Teilsystemen besteht, die in einem thermischen Kontakt stehen, so dass sie nach einer Relaxationszeit in einem Gleichgewichtszustand vorliegen [112]. Somit werden N (Anzahl der Teilchen), V (Volumen) konstant gehalten und T (Temperatur) an ein äußeres Wärmebad mit eingestellter Temperatur (zweites Teilsystem) gekoppelt, so dass das Volumen des ersten Teilsystems sich daran äquilibriert [96, 113].

Dies geschieht über einen Thermostat, der den gewünschten Wert einstellt. Es können hierfür verschiedene Modelle verwendet werden, die meist genutzt sind der mit einer schwachen Temperaturkopplung arbeitende Berendsen-Thermostat, der stochastisch, zufällig generierte Werte verwendende Andersen-Thermostat, ferner das erweiterte Ensembleschema nach Nosé-Hoover und das „velocity-rescaling“-Schema, mit dem die Geschwindigkeit der Teilchen angepasst wird [89].

Bei dem Berendsen-Thermostat handelt es sich um einen Algorithmus, der eine schwache Kopplung des Systems zu einem externen Wärmebad mit einer Kinetik 1.Ordnung simuliert (**Formel 5-10**) [114].

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau}$$

Formel 5-10

T : Temperatur [K]

t : Zeit [s]

T_0 : Referenztemperatur des Wärmebades [K]

τ : Zeitschritt [s]

Aus **Formel 5-10** lässt sich erkennen, dass eine Abweichung von T_0 , bei einem zu gering gewählten Wert für τ , nur langsam korrigiert wird. Aber es werden auch Fluktuationen in der kinetischen Energie der Teilchen im System unterdrückt, daher wird kein richtiges kanonisches System erzeugt und somit sind die erzeugten Werte unpräzise. Der erzeugte Fehler ist umgekehrt proportional zu der Anzahl der Teilchen, d.h. umso größer das System ist, umso kleiner ist der Fehler. Aus der Vernachlässigung der fluktuierenden kinetischen Energie geht auch hervor, dass Eigenschaften, die hiervon abhängen, wie z.B. die Wärmekapazität, beeinflusst sind. Dieser Thermostat eignet sich hauptsächlich um ein System zu relaxieren, d.h. die Ausgangssituation für eine MD-Simulation herzustellen in der die Temperatur, Druck, Volumen und Teilchenzahl nicht mehr fluktuieren sollen [89].

Ein Thermostat, der Fluktuationen berücksichtigt, ist der „velocity-rescale-Thermostat, welcher auf dem gleichnamigen Schema beruht. Hier wird der Eintrag von Wärmeenergie in das System oder der Fluss der Wärmeenergie aus dem System heraus durch Anpassen der Geschwindigkeit nach jedem Zeitschritt simuliert. Die Anpassung basiert auf einem stochastischen Term, der die kinetische Energieverteilung korrigiert [89].

Dieser Thermostat benötigt zusätzlich nur zufällig erzeugte kinetische Energien für die verschiedenen Moleküle. Außerdem bietet er die gleichen Vorteile, die der Berendsen-Thermostat besitzt. Also keine oszillierenden Temperaturen und eine Temperaturangleichung 1. Ordnung [89].

Der Andersen-Thermostat basiert auf einem NVE-Integrator (konstante Teilchenzahl, Volumen und Energie). Der Thermostat wählt in regelmäßigen Abständen die Geschwindigkeit der Teilchen aus einer Maxwell-Boltzmann-Verteilung, mit einer maximalen Wahrscheinlichkeitsdichte für die eingestellte Temperatur, aus. Nichtsdestotrotz wird durch diesen Thermostat auch die Kinetik eines Systems verlangsamt, so dass die Kinetik und Transportprozesse innerhalb der Simulation nicht korrekt wiedergespiegelt werden können.

Nosé-Hoover-Temperaturkopplung ist eine weitere Variante eines Thermostats. Dieser Thermostat eignet sich deutlich besser um ein kanonisches Ensemble zu simulieren, da hier nicht nur eine

schwache Temperaturkopplung vorliegt. Der Beschleunigungsterm des Thermostats besitzt zwei weitere Elemente: ein thermisches Reservoir und einen Reibungsterm [89, 115].

Im Unterschied zu dem Berendsen-Thermostat, zeigt der Nosé-Hoover-Thermostat oszillierende Relaxationseigenschaften und keine exponentielle. Dadurch eignet sich dieser weniger zur Relaxation eines Systems, da sich die benötigte Zeit um den Faktor 4 bis 5 erhöht [89]. Ein weiterer Nachteil dieses Thermostats ist auch, dass in einfachen Systemen, die aus einer Ansammlung harmonischer Oszillatoren bestehen, die MD-Simulation nicht-ergodizit sein kann. In diesem Fall kann nur eine Teilmenge des Phasenraumes bestimmt werden.

Die bisher vorgestellte Methode der NVT-Simulation besitzt einen großen Nachteil, der beim Erheben von Daten kritisch ist. Da, nach Gibbs, bei konstanter Teilchenzahl und konstantem Volumen, eine Änderung der Gesamtenergie zu einer Druckänderung führt, finden nach dem Relaxieren mittels NVT-Ensemble keine Simulationen unter Normalbedingungen mehr statt. Hierfür ist nun noch eine Drucksteuerung, ein Barostat, notwendig und ein variables Volumen, da andernfalls Temperatur und Druck (p) zwangsläufig von den Standardbedingungen abweichen müssen. Aus diesen Gründen verwendet man zum Erheben von Daten ein NpT-Ensemble, dabei stehen verschiedene Barostate zur Verfügung, die die Raumvektoren, in jedem Iterationsschritt, entsprechend skalieren können. Die am häufigsten verwendeten sind die Druckkopplung nach Berendsen, der Ansatz des erweiterten Ensembles nach Parrinello-Rahman und - geeignet für die „Velocity-verlet“-Simulationen - die Anwendung des Martyna-Tucker-Tobias-Klein-Barostats (MTTK) [89, 114].

Der Berendsen-Barostat ändert die Koordinaten des Raumes in jedem Iterationsschritt mit Hilfe einer Matrix μ . Dies geschieht analog zu dem Berendsen-Thermostat mit Hilfe einer Annäherung an einen Referenzdruck durch eine Kinetik 1. Ordnung (**Formel 5-11**).

$$\frac{dp}{dt} = \frac{p_0 - p}{\tau_p}$$

Formel 5-11

p : Druck [bar]

t : Zeit [s]

p_0 : Referenzdruck [bar]

τ_p : Druckkopplungszeitkonstante [s]

Die Parrinello-Rahman-Druckkopplung eignet sich besonders für kleine Systeme und wenn Fluktuationen von Druck und Volumen von Bedeutung sind. Gerade in kleinen Systemen können schwach koppelnde Barostate, wie z. B. der Berendsen-Barostat, keine wahren NpT-Bedingungen simulieren. In diesen Fällen bietet sich der Parrinello-Rahman-Barostat an, der Ähnlichkeiten zu dem Nosé-Hoover-Thermostat aufweist.

Für die Parrinello-Rahman-Druckkopplung gilt, wie für den Nosé-Hoover-Thermostat, das verglichen mit der Berendsen-Kopplung das Äquilibrium nach einem 4- bis 5-fach längeren Zeitraum erreicht wird [89].

Die MTTK-Kopplung verbindet in seinen Termen sowohl Druck- als auch Temperaturkopplung des Systems und erlaubt, unter Anwendung des „velocity verlet“-Integrators, Korrekturen von Integrationsfehlern [89].

5.3.4. Auswertung der Simulation

Betrachtet man die Literatur, die sich mit MD-Simulationen beschäftigt, genauer, so stellt man fest, dass sehr viele Kurzmitteilungen, Artikel und Übersichtsartikel zwar Ergebnisse dieser Untersuchungen beschreiben, aber nur wenig über notwendige begleitende Untersuchungen zur Qualitätssicherung und deren Umfang berichtet wird. Der erste Schritt zu verlässlichen Ergebnissen ist die Validierung der MD-Simulation an sich. In der Literatur werden hierzu 5 qualitätsbestimmende Faktoren benannt, auf die der Anwender mehr oder weniger Einfluss hat. Hierbei handelt es sich um die Qualität der zu Grunde liegenden Theorie oder des Modells, die Richtigkeit der Zwischenatomwechselwirkungsfunktion oder des Kraftfeldes, den Grad der Stichprobennahme während der Simulation mit dem dazugehörigen Grad an statistischer Aufbereitung und das Erreichen einer konvergenten Struktur während der Simulation, die Qualität der Simulationssoftware und den richtigen Umgang mit dieser durch den Anwender [116]. Aufbauend auf diesen Grundlagen schlugen Murdock *et al.* vor, dass die Qualität von Simulationen durch eine Reihe von berechneten Parametern genauer charakterisiert werden sollte. Durch diese Charakterisierung soll eine Vergleichbarkeit zwischen Simulationen verschiedener Arbeitsgruppen ermöglicht werden und eine Aussage über die Güte eines simulierten Systems gemacht werden können. Die Angaben zur Qualität sollten Werte der veränderbaren Parameter, Angaben zu dem verwendeten Computer sowie zu Grunde liegender Bedingungen, thermodynamische Messwerte, Aussagen zur Konvergenz und Fluktuation des Systems enthalten [117].

Es wird empfohlen, dass eine eindeutige Bezeichnung des Systems mit (falls vorhanden) „Protein Data Bank Identifier“, die Länge der Zeitschritte, die Häufigkeit der Probennahme (Häufigkeit der Niederschrift von Daten), die Gesamtzahl der erhobenen Datenpunkte, die verwendete Software, das verwendete Ensemble mit Thermostat, Barostat und ihren Relaxationszeiten sowie Angaben zu der verwendeten Temperatur und Druck, Verwendung von „periodic boundary condition“ zusammen mit der Form der Elementarzelle, das verwendete Kraftfeld, das Lösemittel und sein Modell sowie die Behandlung von elektrostatischen Kräften (cut-off-Schema und cut-off-Distanz) berichtet werden [117].

Die thermodynamische Stabilität der Simulation kann mittels thermodynamischer Messwerte überprüft werden. Hierzu dienen die potentielle und kinetische Energie, die Teilchendichte, der Druck, das Volumen der Elementarzelle bzw. ihre Ausmaße sowie die spezifische Wärmekapazität. Die kinetische Energie wird in diesem Fall in Form der Temperatur überprüft und sollte bei einem NVT-Ensemble sowie NpT-Ensemble nur geringe Fluktuationen aufweisen. Im Gegensatz zum Gesamtdruck des Systems, dieser sollte in einer NpT-Ensemble-basierten Simulation zwar annähernd konstant bleiben, darf sich aber bei einer NVT-MD-Simulation ändern.

Die Änderungen in Gesamtdruck, Temperatur und Gesamtenergie geben Auskunft über die Integrität des Systems. Ist nur eine geringe Fluktuation über den gesamten Simulationszeitraum zu beobachten, dann kann das System als stabil angesehen werden. Ist hingegen ein Abdriften im zeitlichen Verlauf festzustellen, dann wurde vor der Simulation das Gleichgewicht nicht erreicht [117]. Hingegen werden geringe Änderungen über einen längeren Zeitabschnitt meist auf Näherungen des verwendeten Iterationsverfahrens zurückgeführt, z.B. die Bewegung eines Teilchens in den Bereich des cut-offs zwischen zwei weitreichenden Wechselwirkungsberechnungsschritten [89].

Der nächste Schritt beinhaltet die Überprüfung der simulierten Struktur. Ein Maß für die Güte einzelner Strukturen innerhalb der MD-Simulation ist der sogenannte RMSD-Wert. RMSD steht für „root mean square deviation“ und ist ein Maß für die Abweichung einer Struktur von einer Referenzstruktur. Es handelt sich hierbei um die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (**Formel 5-12**) [89].

$$RMSD(t_1, t_2) = \sqrt{\frac{1}{M} * \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2}$$

Formel 5-12

RMSD: Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung [\AA]

t_1 : Struktur des Moleküls zum Zeitpunkt t

t_2 : Referenzstruktur des Moleküls

M : Summe der Atommassen von i bis N des Moleküls [g]

m_i : Masse des i -ten Atoms [g]

N : Anzahl der Atome innerhalb der Struktur

r_i : Koordinaten des i -ten Atoms der Struktur in Bezug auf den Massenschwerpunkt [\AA]

Wie **Formel 5-12** zu entnehmen ist findet bei diesem Verfahren eine Anpassung der Struktur an die Referenzstruktur, durch die Massen m_i , mittels Anpassung durch das Verfahren der kleinsten Quadrate („least square fit method“) statt. Der RMSD-Wert gibt hierbei einen Durchschnittswert der Abweichung bezogen auf eine Struktur wieder. Eine Betrachtung der zeitlichen Abweichung ist mit Hilfe des RMSF-Wertes („root mean square fluctuation“) möglich. Aus **Formel 5-13** geht hervor, dass in diesem Fall nicht über die Masse m_i gemittelt wird, sondern über das Zeitintervall T .

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} * \sum_{t_j=1}^T |r_i(t_j) - r_i^{ref}|^2}$$

Formel 5-13

RMSF_i: Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung einer Struktur von dem zeitlichen Mittel [\AA]

T : Zeitspanne über die gemittelt wird [s]

r_i : Position des i -ten Atoms der Struktur in Bezug auf den Massenschwerpunkt [\AA]

t_j : Struktur zum Zeitpunkt t

r_i^{ref} : Koordinaten des i -ten Atoms der Referenzstruktur [\AA]

Der Gyrationradius ist ein Maß für die Kompaktheit von Strukturen und gibt an wie die Masse einer Gruppe von Atomen um ihr Massenzentrum verteilt ist [117]. Eine Vergrößerung dieses Wertes ist, gerade bei Proteinen, ein Anzeichen für eine Entfaltung der Struktur. Bei Proteinen bedeutet dies zu meist eine Lockerung bzw. Auflösung von Sekundärstrukturen [89].

Auch das „Clustern“, also Gruppieren von ähnlichen Strukturen einer Simulation in Gruppen, Untersuchungen von Wasserstoffbrückenbindungen und Sekundärstrukturen von Proteinen sowie die Suche nach Minima der potentiellen Energie sind gängige Untersuchungen, die Aufschluss über die Qualität eines Modells geben [89].

Die potentielle Energie dient hierbei der Suche nach stabilen Konformationen, die während der MD-Simulation „besucht“ wurden. Sie stellen sich als globales Minimum und lokale Minima im „potentielle Energie-Zeit“-Diagramm dar. Es ist zu erwähnen, dass das gefundene globale Minimum nicht zwangsläufig dem globalen Minimum des gesamten Konformationsraumes entspricht, da bei einer MD-Simulation nicht der gesamte Konformationsraum abgedeckt werden kann [89, 118].

Das Zusammenführen von ähnlichen Strukturen zu Strukturclustern ist eine weitere Methode um stabile Konformere zu identifizieren und Änderungen in der räumlichen Struktur von Proteinen zu erkennen. Hierfür gibt es viele verschiedene Methoden. Die häufigste Methode, die für Trajektorien angewandt wird, ist die Methode nach Daura *et al.* Hierbei wird ein Grenzwert für die Ähnlichkeit von Strukturen in Form eines RMSD-Wertes festgelegt und alle Strukturen, die eine Vielzahl ähnlicher Strukturmerkmale aufweisen, werden als Leitstruktur für den jeweiligen Cluster gewählt. Diese Struktur wird dann mit allen ähnlichen Strukturen aus dem Pool der simulierten Strukturen entfernt und der Prozess wiederholt [119].

5.4. Vorhersagen von Struktur und physikochemischen Eigenschaften von Proteinen

Trotz wachsender Zahl aufgeklärter Proteinstrukturen und Zugriff auf diese über Datenbanken, sind noch viele Strukturen unbekannt [120, 121]. Die Umstände für das Fehlen von Strukturen in den Datenbanken können viele Gründe haben und reichen von fehlenden Untersuchungen von Proteinen bis zu einer problematischen Erfassung mittels strukturaufklärenden Techniken, wie Röntgenstrukturanalyse, Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS) [122].

Dennoch können für diese Proteine Strukturvorhersagen getroffen werden und diese für computerchemische Untersuchungen genutzt werden, um Eigenschaften des Proteins zu prognostizieren. Diese Vorhersagen können von einer einfachen Angabe der möglichen Sekundärstruktur, des isoelektrischen Punktes und der Ladung bei verschiedenen pH-Werten durch die Analyse der Aminosäuresequenz bis hin zu einem 3D-Modell, das auf Ähnlichkeiten zu einem strukturell bekannten Protein beruht, reichen [14, 123, 124].

Es wird des Weiteren auch von De-novo-Modellentwicklungen berichtet, die ohne verlässliche Strukturvorlage auskommen [124].

5.4.1. Homologiemodellierung

5.4.1.1 Erstellung von Homologiemodellen

Die Entwicklung eines Homologiemodells beruht im Wesentlichen auf Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz, hierbei werden auch Variationen berücksichtigt, die auf Austausch von Aminosäuren durch Aminosäuren mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften beruhen. Die Vorhersage der Struktur dient meist als vorbereitender Schritt um auch die Funktion mittels Homologien vorhersagen zu können [125].

Ein Hindernis bei diesem Unterfangen ist häufig das Fehlen einer geeigneten Vorlage in den Proteindatenbanken. Proteine mit einer Sequenzübereinstimmung von weniger als 30 % müssen in diesem Fall meist von Grund auf modelliert werden. Proteine mit Übereinstimmungen oberhalb von 10 % werden auch als Zwielflichtzonen-Proteine („twilight-zone proteins“) bezeichnet [124]. Dieser Spezialfall von Aminosäuresequenzen kann auf unterschiedliche Weise behandelt werden. Unter Verwendung einer Vorlage mit einer Wertung der Übereinstimmung zwischen Sekundärstrukturelementen, nennt man diese Methode „threading method“ also „einfädelnde Methode“ [124].

Alternativ zu dieser Methode stehen die vorlagenlose Modellierungen, auch bekannt als *ab-initio*- oder *de-novo*-Methoden. Bei diesen Methoden wird nicht auf ein Protein als Vorlage zurückgegriffen, sondern der Konformationsraum der Zielstruktur wird eingeschränkt und anschließend werden Energieminima bestimmt. Dies geschieht durch einen Vergleich von kurzen Fragmenten des Proteins mit Peptidfragmenten aus einer Datenbank, nach der Bestimmung der Sekundärstruktur. Die Fragmente aus der Datenbank dienen dabei als Vorlage für Teile des Proteins. Es werden auch mittels eines Monte-Carlo-Algorithmus verschiedene Segmente erprobt und die verschiedenen Möglichkeiten anschließend bewertet [124]. Ein weiterer Trend in der Behandlung dieser Proteine ist eine Hybrid-Technik, die beide Ansätze vereint [124].

Der Fall einer hohen Sequenzähnlichkeit zwischen der Vorlage und der Aminosäuresequenz gestaltet sich hierbei deutlich einfacher, da geringere Anteile an nicht identischen Fragmenten auftreten. In diesem Fall werden zunächst die Aminosäuresequenzen aneinander ausgerichtet, die 3D-Struktur der Vorlage der Zielsequenz aufoktroyiert und anschließend das Modell verfeinert [126].

5.4.1.2 Validierung von Homologiemodellen

Die erhaltenen Homologiemodelle können sich sehr stark in ihrer Qualität unterscheiden und teilweise auch entscheidende Fehler aufweisen [126].

Die Qualität wird häufig durch eine Kombination von stereochemischen Plausibilitätsprüfungen, wissensbasierten, statistischen Potentialen, Energiefunktionen oder Modellkonsensus-Ansätzen überprüft. Sie kann mittels „Scores“ direkt mit experimentell bestimmten Strukturen verglichen werden [127–130].

Eine Möglichkeit um die Plausibilität der Stereochemie zu überprüfen ist das Ramachandran-Diagramm. Bei dieser Darstellung werden die Diederwinkel *phi* und *psi*, am α -Kohlenstoffatom der einzelnen Aminosäurereste, grafisch aufgetragen (**Abbildung 24**).

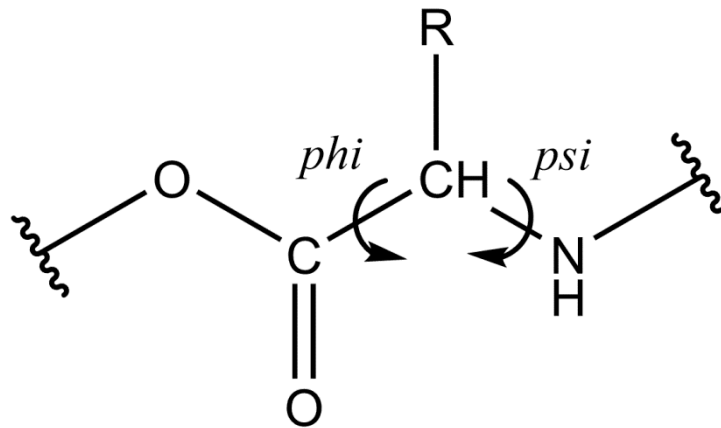


Abbildung 24 Darstellung der Winkel *phi* und *psi* am α -Kohlenstoffatom eines Aminosäurerestes in einem Peptid.

Das Diagramm weist hierbei 4 Bereiche auf. Strukturtypisch sind die Bereiche für α -Helices, β -Faltblätter und linksgängige Helices. Die „disallowed area“ (Nichterlaubte Bereich) ist der 4. Bereich und beschreibt ein Areal in dem ungünstige Kombinationen der beiden Winkel liegen (**Abbildung 25**) [131].

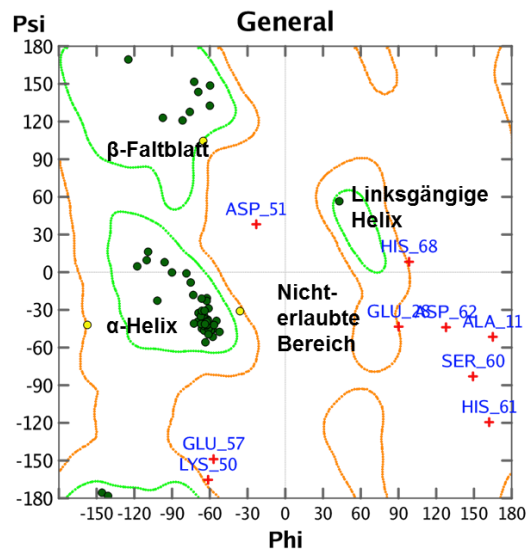


Abbildung 25 Ramachandran-Plot eines modellierten Proteins. Grün umrandete Bereiche zeigen optimale Diederwinkel zwischen den Winkeln *psi* und *phi* für die jeweiligen Strukturelemente. Rotumrandete Bereiche grenzen den Nichterlaubten Bereich ab nach Nachbar *et al.* [133].

Internetbasierte Bewertungsprogramme verwenden im Vergleich zu den sterischen Deskriptoren des Ramachandran-Diagramms weitere Parameter um die Qualität zu beschreiben und diese als standardisierten Zahlenwert, den „Z-score“, auszugeben. Es handelt sich bei den Parametern um die Torsionswinkel über drei aufeinander folgende Aminosäuren, entfernungsabhängige Interaktionspotentiale, die Abweichung der Sekundärstruktur von dem berechneten Wert und die Zugänglichkeit der Struktur für Wasser. Der „Z-score“ wird durch Vergleich der Struktur mit ähnlichen Strukturen aus der Datenbank gebildet [130].

Die Abhängigkeit des „Z-scores“ von der Verfügbarkeit ähnlicher, aufgeklärter Strukturen kann hier zu niedrigen Werten führen, besonders bei intrinsisch ungeordneten Proteinen (IDPs) empfiehlt sich ein eigenes Ensemble an Strukturen zu verwenden, da bei diesen Proteinen die Variabilität der Strukturen deutlich höher ist [130].

5.4.2. Weitere Methoden in der Modellentwicklung

Alternativ zum Modellieren anhand einer bekannten Struktur gibt es noch weitere Methoden, die große Teile des Konformationsraums abtasten. Diese Methoden finden meist mehrere Minima und liefern daher nicht nur ein Ergebnis, sondern mehrere. Hierfür werden hauptsächlich stochastische Methoden, Monte-Carlo-Simulationen, MD-Simulationen mit anschließender Clusteranalyse, simuliertes Tempern der Struktur mit anschließendem Abkühlen und genetische Algorithmen, bei denen die Anfangsstruktur hin zu dem globalen Minimum „evolviert“ werden, verwendet [92].

5.4.2.1. Stochastische Methoden

Stochastische Methoden beruhen prinzipiell auf der zufälligen Veränderung der kartesischen Koordinaten der einzelnen Atome in einer Struktur bzw. der Diederwinkel. Aufgrund von häufig verwendeten Gewichtungsfunktionen für die potentielle Energie der erhaltenen Strukturen und der daraus sich ergebenden Boltzmann-Verteilung der Strukturen sind diese Ergebnisse bei Verwendung von Monte-Carlo-Simulationen nicht völlig zufällig. Da ein Zufallsmechanismus bei dieser Suche enthalten ist, ist es nicht nur empfehlenswert den gleichen Prozess zu wiederholen, sondern auch andere Ausgangskonformationen der Struktur zu verwenden [92].

5.4.2.2. Clusteranalyse

Die Clusteranalyse unterscheidet sich von den anderen hinsichtlich ihrer Eignung als Metaanalysemethode. Sie kann zur Analyse von Strukturensamples, die mit den anderen Methoden der Modellentwicklung generiert wurden oder durch Analyse der Trajektorie von MD-Simulationen, z.B. eines Homologiemodells in einem Lösemittel, verwendet werden.

Bei dieser Methode werden die Elemente des Datensatzes nach Ähnlichkeit in Cluster gruppiert. Hierbei können die Anzahl der Elemente und deren Durchschnittsstruktur mögliche Konformere der Struktur bzw. ihre Konformerensamples kennzeichnen [92, 133].

Um genügend unterschiedliche Konformere durch eine MD-Simulation zu erhalten, bietet sich hier die „Grobkörnige“- bzw. „coarse-graining“-Methode an. In diesem Spezialfall wird die Anzahl der Freiheitsgrade durch Reduktion des Proteins auf seine α -Kohlenstoffatome verringert. Diese Methode bildet das Modell zwar ungenauer ab, bietet aber den Vorteil, dass ein größerer Konformationsraum in derselben Zeit abgebildet werden kann [118].

Weitere Ansätze verändern das verwendete Kraftfeld, um einen Bias in Richtung eines Teils des Konformationsraumes zu erzielen. Hier ist besonders das Regenschirm- bzw. „Umbrella“-sampling zu erwähnen. Bei dieser Methode wird eine Gewichtungsfunktion in das Kraftfeld eingeführt um Ergebnisse außerhalb eines bestimmten Teils des Konformationsraumes zu verhindern. Anschließend wird diese Funktion entfernt um eine korrekte Gewichtung innerhalb dieses Raumes zu erhalten. [118, 134] Mit dieser Methode ist ein weiterer Ansatz verwandt, der die Energielandschaft des Proteins verändert, in dem die Energieminima angehoben werden und somit ein Bereich beprobt werden kann, der mit konventionellen MD-Simulationen nicht zugänglich ist [118].

Als am effektivsten beschrieben wurde eine Methode, bei der die „besuchten“ Energieminima mit einer Gauss-funktionsförmigen „Straf“-energie belegt werden, so dass diese Konformation kein zweites Mal besucht wird [118].

5.4.2.3. Free Energy Perturbation

„Free Energy Perturbation“ ist ein weiterer Ansatz zur Modellentwicklung. Diese Methode eignet sich besonders für Komplexe in großen Systemen, wie z.B. Enzym-Substrat-Komplexe. Hierbei wird der Enthalpie-Unterschied zwischen freiem Zentralteilchen und des Komplexes für unterschiedliche Orientierungen des Zentralteilchens bzw. des Komplexbildners betrachtet [92].

6. Das Peptid GAPAGPLIVPY

Die Wahl des Undekamer-Peptids mit dem Einbuchstabencode GAPAGPLIVPY (GAPAG) für affinitätskapillarelektrophoretische Untersuchungen begründet sich sowohl auf die Relevanz des ursprünglichen Proteins in vielen unterschiedlichen physiologischen Prozessen, wie Zellmigration und Aktivierung unterschiedlicher Signalwege, als auch auf dessen bereits massenspektrometrisch bestimmten Eigenschaften [135]. Bei GAPAG handelt es sich um ein Bestandteil aus einem Verdau des rekombinanten, humanen Galectin-3-Proteins (UniProt-Nummer: P17931) mittels Chymotrypsin und der Peptidase AspN [136].

Bemerkenswert an der Sequenz des Peptides ist sein hoher Anteil an *L*-Prolylresten (Einbuchstabencode: P) gemessen an der Länge seiner Gesamtsequenz. Die Verwendung eines Verdau, also einer Mischung aus unterschiedlichen Fragmenten, anstatt eines gesamten Proteins ist in der Massenspektrometrie eine weit verbreitete Methode. Sie wird „Bottom-up“-Ansatz genannt und wird häufig zur Sequenzanalyse und Identifikation von Proteinen eingesetzt [137]. In diesem Fall wurden bei Anwendung dieses Verfahrens Effekte beobachtet, bei denen nicht klar ist, ob es sich um messtechnische Artefakte oder physiologisch bedeutsame Vorgänge handelt. Zur Klärung dieser Frage sind daher zusätzliche Experimente mit orthogonalen Techniken erforderlich, die auf anderen Messprinzipien beruhen, aber zu den gleichen Protein-Eigenschaften Informationen liefern. Hierfür ist die Affinitätskapillarelektrophorese ein aussichtsreiches Verfahren.

6.1. *Galectin-3 und seine physiologischen Funktionen*

Galectin-3 ist ein Protein mit pleiotropen Wirkungen, es kann also an verschiedenen Zielstrukturen unterschiedliche Wirkungen hervorrufen. Hierbei handelt es sich um ein 29 bis 35 kDa großes, β -Galactosid-bindendes Lektin mit ein oder zwei Kohlenhydratbindungsdomänen am C-terminalen Ende der Peptidkette. Das Protein wird in vielen Säugetieren exprimiert und kommt sowohl intrazellulär als auch extrazellulär in vielen verschiedenen Geweben vor [135, 138]. Galectin-3 konnte in unterschiedlichen Zellen der Nieren, der Lunge, des Gastrointestinal-Traktes, der Haut, den männlichen sowie auch weiblichen Geschlechtsorganen und unterschiedlichen Gliazellen des Zentralen Nervensystems nachgewiesen werden [138].

Intrazellulär ist es sowohl im Cytosol als auch im Nukleus lokalisiert. Es bindet dort an andere Proteine und aktiviert unterschiedliche Signalwege mittels Protein-Protein-Wechselwirkung oder nimmt Einfluss auf das Spleißen der prä-mRNA. Vorgänge, die sich auf Galectin-3 zurückführen lassen, sind die Aktivierung des Zellzyklus, akute und chronische Entzündungsreaktionen sowie Tumorwachstum fördernde Prozesse [135].

Das Lektin wird auch auf einem nicht-klassischen Signalweg in den extrazellulären Raum durch Ektocytose bzw. „plasma-membrane shedding“ sekretiert. Bei diesem Vorgang wird unter Ausbildung eines „Bläschens“ (Vorläufer eines Transportvesikels) Galectin-3 an der Plasmamembran unter Aggregation akkumuliert und anschließend in hoher Konzentration exophagocytiert [139]. Im Extrazellulärraum kann es mit den β -Galactoseeinheiten von unterschiedlichen Glykoproteinen interagieren und bildet bei höheren Konzentrationen von multivalenten Glykoproteinen mit diesen eine Gitterstruktur aus. Diese Struktur spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Rezeptor-Clustern, der Endocytose und der Signaltransduktion. Beispiele für die Signalweitergabe, an der Galectin-3 beteiligt

gewöhnlich sollten Spektren für $[M+H+Na]^{2+}$ und $[M+H+K]^{2+}$ bis auf die Massenverschiebung von +16/z gleich aussehen. Auch finden sich über $[M+40]^{2+}$ keinerlei Fragment-Ionen, und die gebildeten Ionen besitzen ausschließlich eine Ladung von +2. Aus diesen Gegebenheiten folgt, dass $[M+40]^{2+}$ kein mobiles Proton besitzt und somit ein $[M+H+K]^{2+}$ -Addukt ausgeschlossen werden kann. Das Signal wurde nach weiteren Experimenten mit dem Undekamer GAPAG $[M+Ca]^{2+}$ zugeordnet, während das Signal bei m/z 538,8 dem Natriumaddukt $[M+H+Na]^{2+}$ entspricht [136].

Kationen- π -Interaktionen als Ursache für die Adduktbildung zwischen GAPAG und Ca^{2+} -Ionen konnten aufgrund von vergleichbaren Affinitäten eines GAPAG-ähnlichen Peptids ohne C-terminalen Tyrosylrest ausgeschlossen werden. Es wurde auch die Sequenzspezifität der Calciumadduktbildung untersucht, und daraufhin als notwendige Sequenzmotive zwei Prolylreste gefunden, die von zwei bis drei Aminosäureresten getrennt vorliegen (Einbuchstabencode: P-XX-P und P-XXX-P) [136].

Die Überprüfung der Selektivität von GAPAG gegenüber Ca^{2+} -Ionen in Anwesenheit von Mg^{2+} -, Sr^{2+} - und Ba^{2+} -Ionen ergab keine spezielle Präferenz für eine dieser Spezies. Aufgrund dieses Ergebnisses konnte Lehmann *et al.* eine physiologische Rolle des Sequenzmotivs weder bestätigen noch ausschließen. Daher wurde das Peptid dieser Arbeit mit einer orthogonalen Technik und zwar der Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophorese auf seine Metallionenbindungseigenschaften in einem physiologisch-ähnlicherem Medium untersucht [136, 140].

6.3. Ergebnisse der Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophoreseuntersuchungen

Die Bestimmung der Metallionenaffinität von GAPAG wurde im wässrigen Milieu, unter Verwendung eines 20 mmol/L Tris-HCl-Puffers, auf weitere Ionen ausgeweitet, so dass Ca^{2+} -, Mg^{2+} -, Sr^{2+} -, Ba^{2+} -, Zn^{2+} -, Au^{3+} -, Mn^{2+} -, Cu^{2+} -, Ni^{2+} - und SeO_3^{2-} -Ionen analysiert wurden. In den einzelnen Untersuchungen wurden die genannten Ionen jeweils in den Konzentrationen 250 μ mol/L und 500 μ mol/L eingesetzt. Eine Ausnahme bildete Zn^{2+} , hier wurde eine 1:10-Verdünnung der beiden Konzentrationen (25 μ mol/L und 50 μ mol/L) verwendet, da aus vorangegangenen Experimenten starke Wechselwirkungen mit der Kapillarinnenwand zu erwarten waren.

Die gemessenen Migrationszeiten für den verwendeten EOF-Marker Acetanilid und das Peptid GAPAG wiesen sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit der Metallionen eine gute Reproduzierbarkeit auf (RSD% < 0,09 % bzw. < 0,9 %). Nur die Versuche mit Zn^{2+} -Ionen zeigten einen Drift in der Migrationszeit, der mit der Adsorption dieser Ionen an der Kapillarinnenwand zusammenhängen kann [140].

Die untersuchten Ionen wiesen in niedrigen Konzentrationen einen geringen Betrag für $\Delta R/R_i$ auf. Eine Ausnahme bildete Mn^{2+} , hier wurde eine moderate Änderung der normalisierten Migrationszeiten auch bei einer Konzentration von 250 μ mol/L gefunden (**Abbildung 27**) [7]. In diesem Fall schneidet das Konfidenzintervall den Wert -0,01, der von Redweik *et al.* als hinreichend für eine signifikante Wechselwirkung bezeichnet wurde.

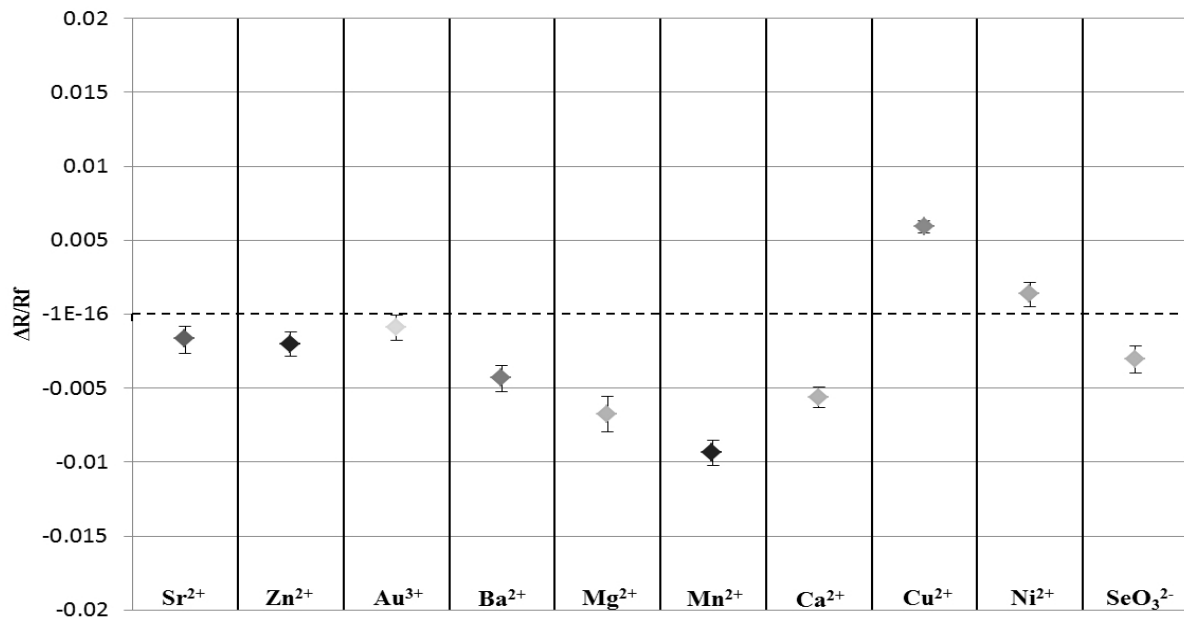


Abbildung 27 Übersicht über $\Delta R/R_f$ -Werte für niedrige Konzentrationen der unterschiedlichen Ionen nach Nachbar *et al.* [140]. Die Balken im Diagramm beschreiben das Konfidenzintervall für einen α -Fehler von 5%. Schneidet das Konfidenzintervall die Null-Linie ist die Änderung des Wertes nicht signifikant.

Für höhere Konzentrationen findet man neben einem hohen $\Delta R/R_f$ -Betrag für Mn^{2+} auch eine starke Änderung der normalisierten Migrationszeiten für Cu^{2+} , die auf eine signifikante Interaktion hinweist (**Abbildung 28**).

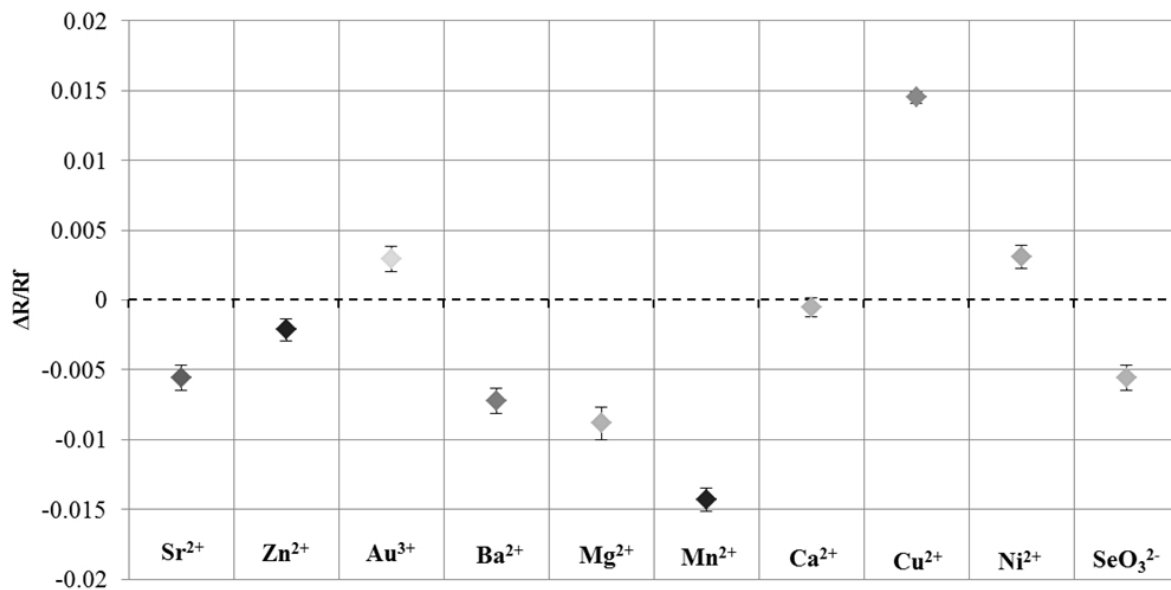


Abbildung 28 Übersicht über $\Delta R/R_f$ -Werte für hohe Konzentrationen der unterschiedlichen Ionen nach Nachbar *et al.* [140]. Die Balken im Diagramm beschreiben das Konfidenzintervall für einen α -Fehler von 5%. Schneidet das Konfidenzintervall die Null-Linie ist die Änderung des Wertes nicht signifikant.

Auch die Elektropherogramme geben weitere Aufschlüsse über die Eigenschaften des Peptids. Bei genauer Betrachtung ist zu erkennen, dass der EOF-Markerpeak und der GAPAG-Peak nicht basisliniengetrent vorliegen (**Abbildung 29**).

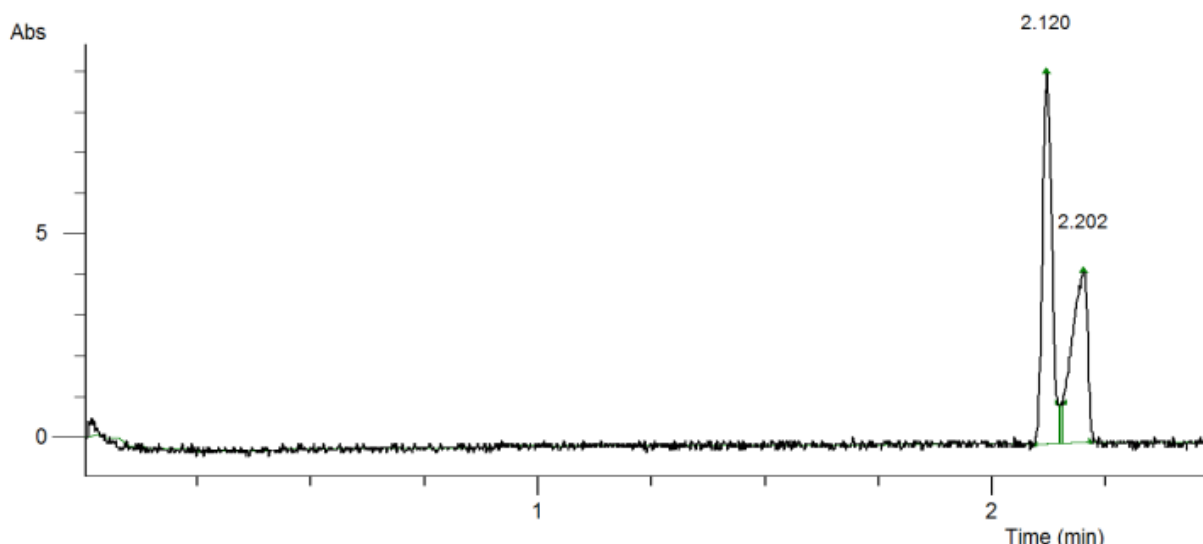


Abbildung 29 Elektropherogramm des Peptids GAPAG (2,202 min) und dem EOF-Marker Acetanilid (2,120 min) nach Nachbar *et al.* [140]. Aufgrund des geringen Größen-Ladungs-Verhältnisses von GAPAG konnte keine Basislinientrennung erreicht werden.

Daher besitzt das Peptid nur eine geringe elektrophoretische Mobilität und ein geringes Größen-Ladungs-Verhältnis. Dies ändert sich in Gegenwart von einigen Metallionen, wie z.B. Ba^{2+} (vgl. **Abbildung 29**). Daher nahm die Auflösung zwischen den Peaks in Anwesenheit von Metallionen im Allgemeinen zu. Die Änderung spiegelt sich auch in den $\Delta R/R_f$ -Werten wieder (vgl. **Abbildung 27**, **Abbildung 28** und **Abbildung 29**).

Die ACE-Experimente zeigten deutlich unterschiedliche Ergebnisse zu den massenspektrometrischen Vorarbeiten von Lehmann *et al.* [136, 140]. So geben diese Ergebnisse einen Hinweis auf mögliche Komplexbildung zwischen GAPAG und Mn^{2+} bzw. Cu^{2+} (**Abbildung 27** und **Abbildung 28**). Die Unterschiede der durch MS und ACE erhaltenen Ergebnisse für die Erdalkalimetallionen sind auf die unterschiedlichen Medien zurückzuführen. Die Komplexbildung zwischen geladenen und ungeladenen Spezies läuft im Vakuum (also bei MS-Untersuchungen) nach anderen Mechanismen ab.

Dunbar *et al.* konnten zeigen, dass es im Vakuum zu einer sogenannten Ladungssolvatisierung („charge solvation“; CS) von Erdalkalimetallionen kommt. Hierbei wird die Ladung nach außen abgeschirmt und hydrophobere Teile des Komplexes auf dessen Oberfläche präsentiert [141, 142]. Diese Informationen bildeten die Grundlage, um die experimentellen Ergebnisse aus der Massenspektrometrie und der Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophorese in einem computerchemischen Modell darzustellen und die Unterschiede im Bindungsverhalten zu erklären.

6.4. Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse mittels in-silico-Methoden

Die Grundlage der Untersuchungen mittels computerchemischer Methoden bildet das Modell des GAPAG- Ca^{2+} -Komplexes im Vakuum. Hierzu wurde die Koordinationszahl des Kations in Peptid- Ca^{2+} -Komplexen mit Hilfe der „Mespeus“-Datenbank evaluiert [143, 144]. Die häufigste KZ von Ca^{2+} in Peptidkomplexen war 7 mit einem RMSD-Wert, der überwiegend für überkappte Oktaeder unter 0,3 Å lag. Auf Grundlage der Ergebnisse von Dunbar *et al.*, die eine überwiegende Koordination an Sauerstoffatomen für Ca^{2+} in Kombination mit einer Ladungssolvatisierung ergaben und der Erkenntnisse aus der „Mespeus“-Datenbank, wurde ein überkappt oktaedrischer GAPAG- Ca^{2+} -Komplex mit einem RMSD-Wert von 0,361 Å gegenüber dem Optimum erstellt (**Abbildung 30**) [141, 142]. Dieser

Wert liegt nur geringfügig über den Werten aus der „Mespeus“-Datenbank und bildet daher den Ausgangspunkt für die folgenden Untersuchungen.

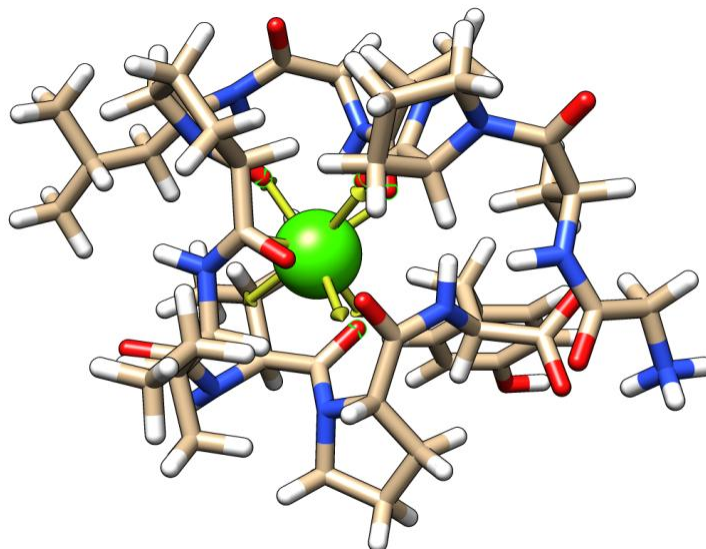


Abbildung 30 Darstellung des GAPAGPLIVPY- Ca^{2+} -Komplexes mit einem überkappt oktaedrisch komplexierten Ca^{2+} -Ion nach Nachbar *et al.* [140]. Der RMSD-Wert für die Abweichung des Komplexes zum optimalen überkappten Oktaeder beträgt 0,361 Å.

Der Modellierung folgte eine MD-Simulation über 200 ps für den GAPAG- Ca^{2+} -Komplex im Vakuum und auch in Wasser. Während der Komplex im wässrigen Medium bereits nach 80 ps dissoziiert war, blieb er im Vakuum über den ganzen Zeitraum stabil (vgl. **Abbildung 31** und **Abbildung 32**).

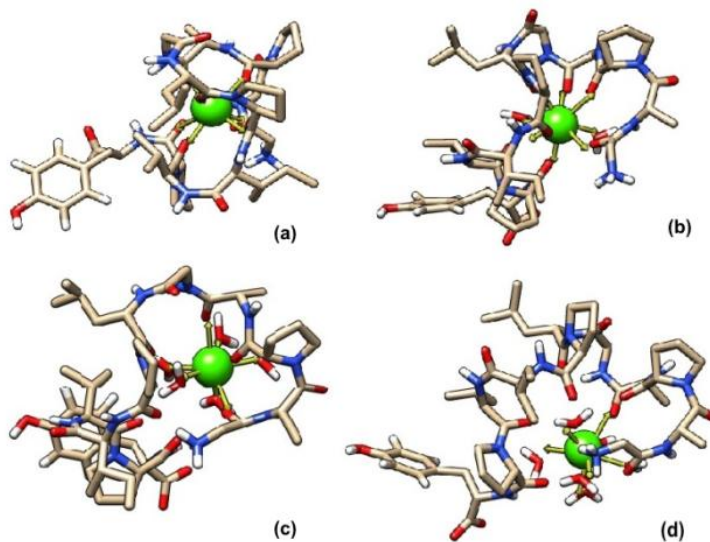


Abbildung 31 Der GAPAG- Ca^{2+} -Komplex in Wasser nach 0 (a), 20 (b), 40 (c) und 80 (d) ps entnommen aus Nachbar *et al.* [140]. Die Einzelbilder zeigen die zunehmende Dissoziation des Komplexes. Chloridion zum Ausgleich der positiven Ladung des Gesamtsystems sind ausgeblendet.

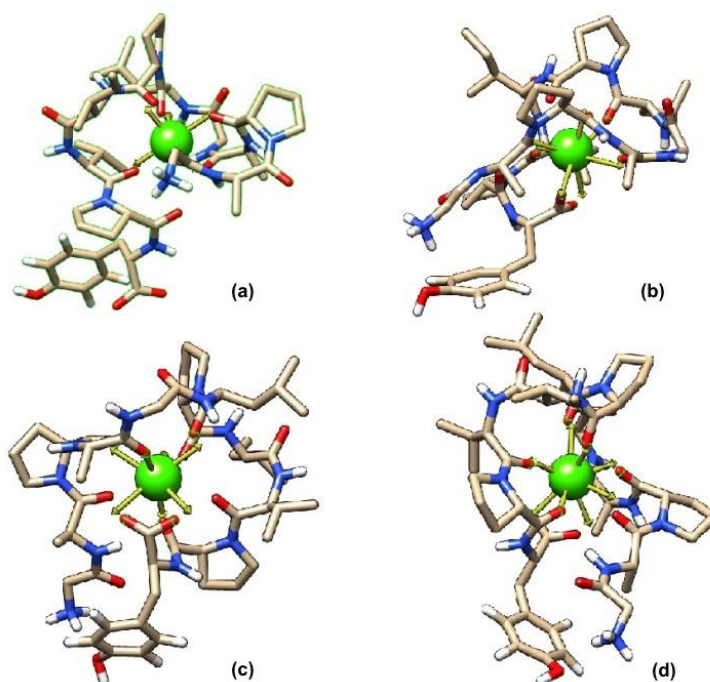


Abbildung 32 Der GAPAG- Ca^{2+} -Komplex im Vakuum nach 0 (a), 40 (b), 80 (c) und 120 (d) ps entnommen aus Nachbar *et al.* [140]. Die Einzelbilder zeigen einen stabilen Komplex.

Nach 200 ps besaß der GAPAG- Ca^{2+} -Komplex im Vakuum noch einen RMSD-Wert von 0,513 Å. Selbst nach einer Langzeitsimulation über 2 µs blieb der Komplex stabil und zeigte nur eine geringe Erhöhung des RMSD-Wertes (0,544 Å).

Bei genauerer Betrachtung der **Abbildung 30** ist zu erkennen, dass sich die hydrophoben Aminosäurereste an der Oberfläche des Komplexes befinden. Dies ist in einer polaren Umgebung eine enthalpisch-ungünstige Konformation, da keine Interaktion mit dem Medium erfolgen kann. Daher entfaltet sich der GAPAG- Ca^{2+} -Komplex während der MD-Simulation in Wasser und das Ca^{2+} -Ion wird durch das umgebende Lösungsmittel solvatisiert.

Im Vakuum ist der GAPAG- Ca^{2+} -Komplex nicht von polaren Molekülen umgeben, somit findet auch keine destabilisierende Interaktion mit umgebenden Teilchen statt. Die in **Abbildung 30** dargestellte Konformation des Komplexes ist aufgrund der elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen der einzigen harten Lewis-Säure Ca^{2+} und den Elektronenpaardonatoren der Peptidbindungen (freie Elektronenpaare der Peptidsauerstoffatome), die eine harte Lewis-Base darstellen, im Zustand der CS stabilisiert. Für ein GAPAG- Cu^{2+} -Komplex-Modell konnte keine Struktur mit einem RMSD-Wert unter 0,64 Å gefunden werden, und es wurde keine MD-Simulation durchgeführt.

Der Anspruch an die Grenze für einen RMSD-Wert begründet sich auf die Arbeiten von Dechancie *et al.* Diese konnten für berechnete Modelle für aktive Zentren im besten Fall einen RMSD-Wert < 0,64 Å im Vergleich zu den experimentell bestimmten Strukturen erreichen [140, 145].

Nichtsdestotrotz konnten für den GAPAG- Ca^{2+} -Komplex die experimentellen Ergebnisse, sowohl aus den MS- als auch ACE-Experimenten, mit Hilfe von *in-silico*-Methoden hinreichend beschrieben werden. Mit Hilfe der MD-Simulationen kann außerdem der Prozess der Dissoziation und der Medium-induzierten Destabilisierung des möglichen Komplexes in wässriger Lösung anschaulich visualisiert werden.

7. Das pflanzliche Protein AtHIRD11

Pflanzen werden sehr stark von Veränderungen in ihrer Umgebung beeinflusst und müssen sich, um überleben zu können, an diese anpassen. Die Anpassungen an wasserassoziierten Umweltstress, wie z. B. Kälte, Dürre und hohe Salzkonzentrationen führen sowohl zu Veränderungen in der Physiologie von Pflanzen als auch in ihren Zellen auf molekularer Ebene. Eine Veränderung in Kormophyten (höhere Pflanzen) ist eine Anreicherung von „late embryogenesis abundant proteins“ (LEAs) also Proteinen, die in der späten Embryogenese reichlich vorkommen. Bei LEA-Proteinen handelt es sich um Proteine mit einer geringen molekularen Masse (ca. 10 – 30 kDa), die die Pflanze vor abiotischem Stress schützen sollen. Diese Proteine können in sieben Klassen unterteilt werden. Die Nomenklatur der Klassen variiert in der Literatur und beschreibt sie nicht immer alle. Am vollständigsten beschreiben die Klassifizierungen in der Pfam-Datenbank und nach Dure die verschiedenen LEAs (**Tabelle 3**) [146, 147].

Tabelle 3 Übersicht über unterschiedliche Nomenklatur der LEA Proteinklassen nach Hundertmark et al. [146].

Pfam	Bray	Dure
Dehydrin	Gruppe 2	D-11
LEA_1	Gruppe 4	D-113
LEA_2	-	LEA14; D-95
LEA_3	-	LEA5; D-73
LEA_4	Gruppe 3; Gruppe 5	D-7; D-29
LEA_5	Gruppe 1	D-19
SMP	Gruppe 6	D-34

Bei genauer Betrachtung des Namens AtHIRD11 stellt man fest, dass die Bezeichnung D-11 nach Dure im Namen enthalten ist und somit das Protein den Dehydrinen zugeordnet werden kann. Dehydrine besitzen sehr spezifische Domänen, die sich als Motive in allen ihren Vertretern wiederfinden lassen. Sie werden als K-, Y- und S-Segment bezeichnet [148].

Das K-Segment ist eine hochkonservierte Domäne, die in allen Dehydrinen vorkommt. Der Name leitet sich aus dem Einbuchstabencode für *L*-Lysin ab, da dieses Segment eine hohe Anzahl an Lysinresten aufweist (Einbuchstabencode: EKKGIMDKIKEKLP oder ähnliche Sequenzen). Diese Domäne kann eine amphiphile α -Helixstruktur ausbilden, die vermutlich zur Bindung an Makromoleküle beiträgt [148-150].

Das Y-Segment ist eine sehr kurze Sequenz (Einbuchstabencode: DEYGNP), die einen *L*-Tyrosinrest enthält und eine gewisse Ähnlichkeit zu einer Nukleotidbindungsstelle aufweist. Das S-Segment ist eine ausgesprochen charakteristische Sequenz, da sie sich durch eine sehr hohe Anzahl an *L*-Serinen

auszeichnet (Einbuchstabencode: LHRSGSSSSSSSED oder ähnliche Sequenzen) und ein Ziel für eine Phosphorylierung des Proteins darstellt [148–152].

Ein weiteres Merkmal dieser Proteingruppe ist die hohe Anzahl an polaren und geladenen Aminosäuren und die dadurch einhergehende Hydrophilie und Hitzestabilität [148, 151].

Es wird auch in der Literatur beschrieben, dass es sich um Proteine handelt, die mit vielen verschiedenen zellulären Strukturen und Molekülen interagieren können und somit verschiedene Signalwege aktivieren bzw. hemmen können. Dehydrine liegen daher, wie andere „protein hubs“ (Proteinknotenpunkt verschiedener Signalwege), intrinsisch ungeordnet vor, d.h. sie bilden keine feste Sekundärstruktur oder andere übergeordnete Strukturen aus [118, 148–152].

Die Besonderheit an intrinsisch ungeordneten Proteinen (IDPs) liegt in ihrer extrem heterogenen Verteilung verschiedener Konformationen. Sie hängt mit der strukturellen Fluktuation von Proteinen zusammen. Zeichnen sich andere Proteine durch eine deutlich schmalere Verteilung an möglichen Strukturen (die gleichzeitig vorliegen können) aus, ist diese bei IDPs deutlich breiter, wie **Abbildung 33** nach Fu *et al.* es an Hand des Gyrationradius veranschaulicht [118].

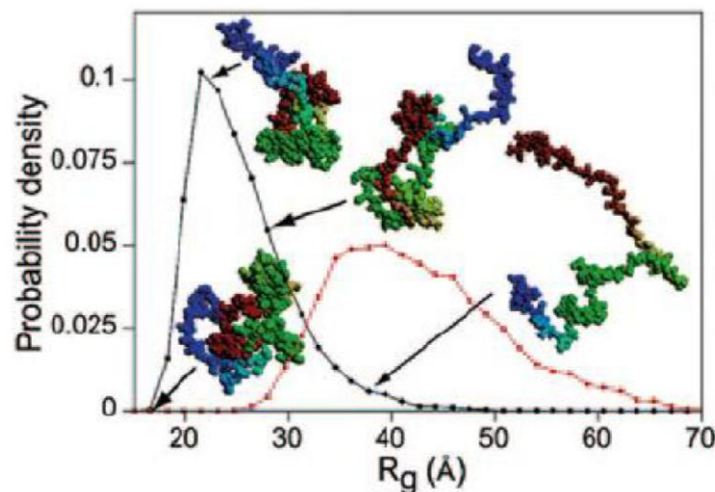


Abbildung 33 Wahrscheinlichkeitsdichte-Gyrationradius-Diagramm für ein „durchschnittliches Protein“ (schwarzgepunktete Linie) und einem intrinsisch ungeordnetem Protein (rotgepunktete Linie) nach Fu *et al.* [118].

Auch ist ein Vergleich der freien Energie in Form einer „Energielandschaft“ (energy landscape) möglich (**Abbildung 34**).

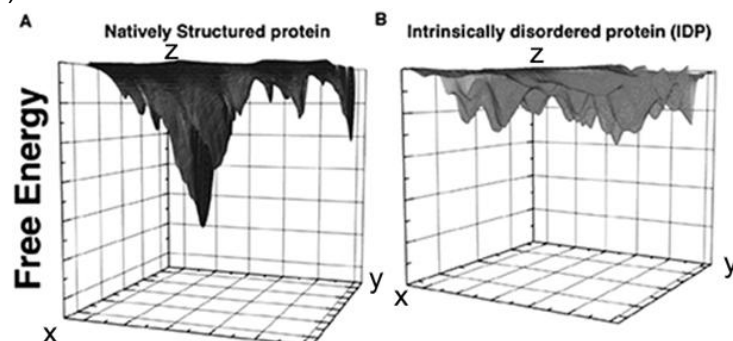


Abbildung 34 Vergleich der „Energielandschaft“ eines nativ-gefalteten Proteins (A) und eines intrinsisch ungeordneten Proteins (B) nach Howton *et al.* [153]. Die x-y-Ebene spiegelt die möglichen Konformationen wider während die z-Achse ihre Gibbsche freie Energie bzw. ihre freie Enthalpie angibt.

Hier ist zu erkennen, dass das IDP kein eindeutiges globales Energieminimum besitzt, sondern viele lokale Minima. Aus dieser Gegebenheit lässt sich folgern, dass man IDPs nicht wie andere Proteine mit einer gemittelten Struktur ausreichend beschreiben kann, sondern ein Strukturensamble benötigt, um das experimentell bestimmte Verhalten zu erklären [133].

7.1. Herkunft und Eigenschaften des Proteins AtHIRD11

Das Dehydrin AtHIRD11 stammt aus der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) aus der Familie der Brassicaceae (Kreuzblütler) und wird durch das Gen At1g54410 kodiert. Mit Hilfe der Aminosäuresequenz wurde, unter Verwendung des Phyre2-Servers und von ProteinCalculator v3.4, eine Analyse der physikochemischen Eigenschaften und der höheren Strukturen des Proteins durchgeführt [124, 154].

Das Programm ProteinCalculator v3.4 berechnete den isoelektrischen Punkt für AtHIRD11 bei pH 7,21 daher weist es bei einem pH-Wert von 7,4 eine Nettoladung von -0,8 e auf. Der pH 7,4 ist von besonderem Interesse, da dieser für die ACE-Experimente verwendet wurde. ProteinCalculator v3.4 bestimmte außerdem ein isotopengemitteltes Molekulargewicht von 10,7966807 kDa (**Tabelle 4**).

Die Strukturanalyse weist auf vier α -helikale Bereiche hin, die von stark ungeordneten Bereichen umgeben sind (**Abbildung 35**). Des Weiteren fällt auf, dass AtHIRD11 keinen L-Cysteinylrest und nur einen L-Methionylrest in der Primärsequenz aufweist. Auch fehlen die aromatischen Aminosäurenreste von L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan, stattdessen findet man viele L-Histidylreste in der Sequenz.

Tabelle 4 Übersicht über mittels ProteinCalculator v3.4 berechnete Eigenschaften [154].

	AtHIRD11
Mittleres Molekülgewicht [Da]	10795,6807
Berechneter isoelektrischer Punkt	7,21
Berechnete Gesamtladung bei pH 7,4	-0,8

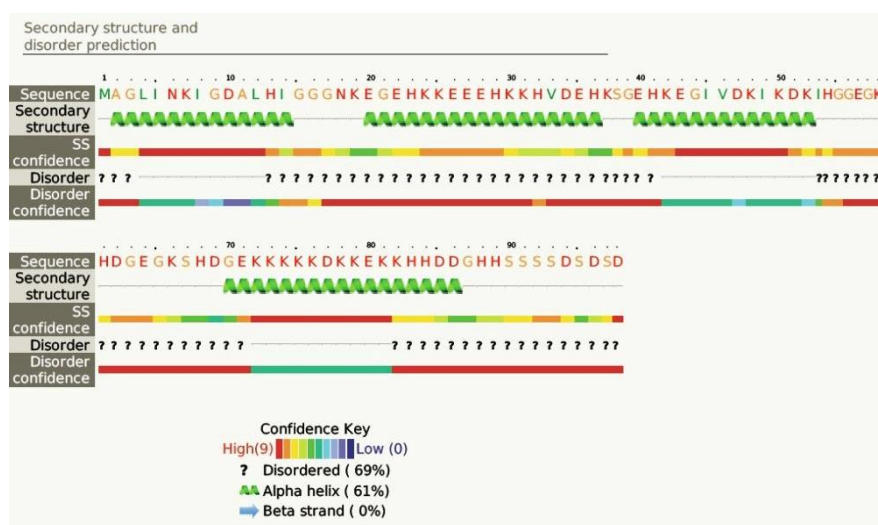


Abbildung 35 Ergebnis der Sequenzanalyse mit Phyre2 mit Zuordnung von α -Helices, β -Faltblattstrukturen und ungeordneten Bereichen zu der Aminosäuresequenz (Angabe im Einbuchstabencode). Der Konfidenzgrad für die vorhergesagte Struktur bzw. Unordnung wird mittels Farbskala angezeigt (rot = hohe Konfidenz, blau-violett niedrige Konfidenz)

Eine Analyse der Proteinsequenz durch das internetbasierte Programm String 9.0 zeigte, dass das korrespondierende Gen auch in *Arabidopsis lyrata*, eine Pflanze derselben Gattung, vorkommt [155, 156].

In beiden Fällen wird das Gen mit AT1G13930 koexprimiert. Das Genprodukt von AT1G13930 ist ein nicht näher beschriebenes Protein, das aufgrund von Knock-out-Experimenten der Antwort auf salzabhängigen Stress zugeordnet werden kann (**Abbildung 36**). Dieses Gen ist, im Gegensatz zu dem AtHIRD11-kodierenden Gen, auch in anderen Pflanzenfamilien verbreitet.

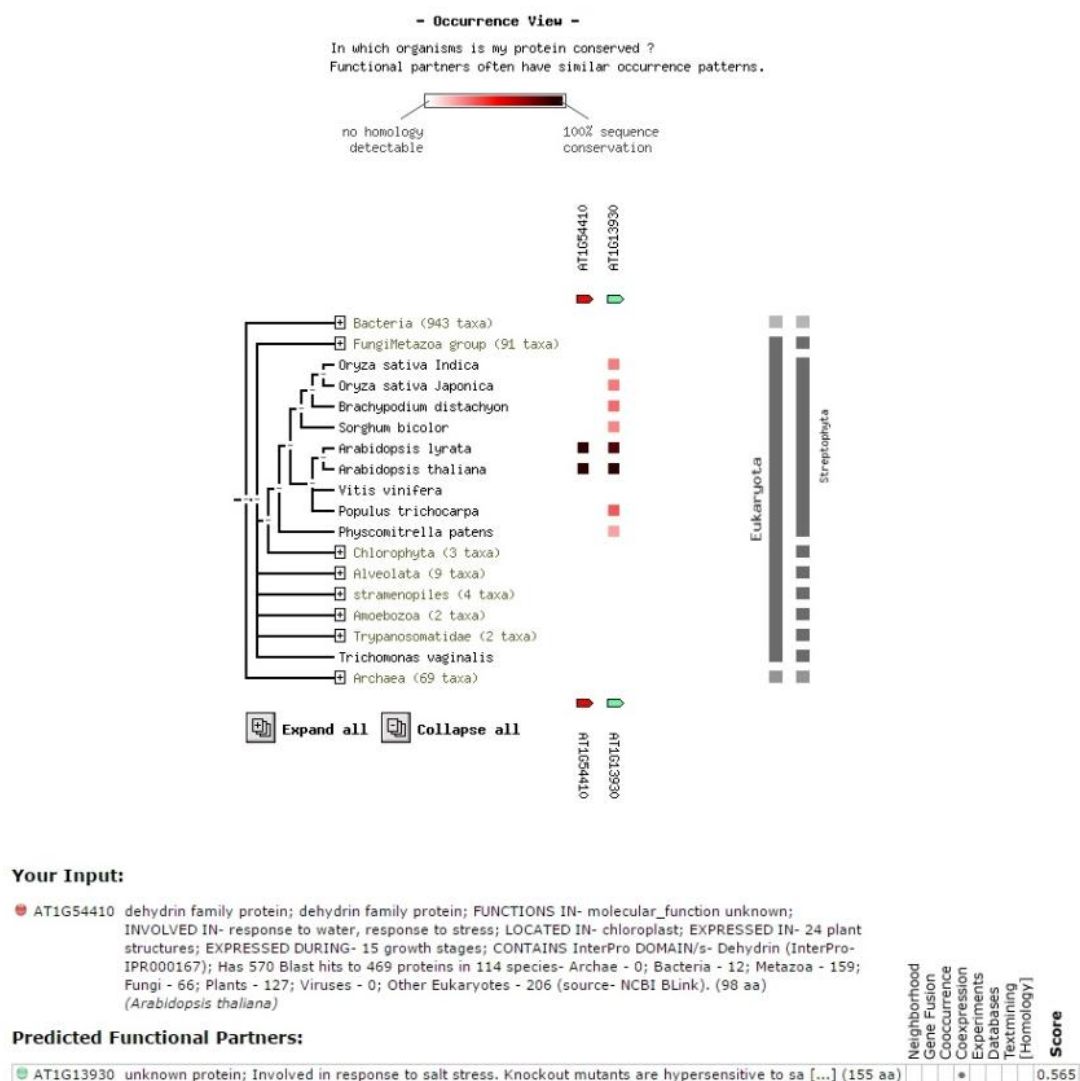


Abbildung 36 Übersicht über die phylogenetischen Beziehungen von AtHIRD11 aufgrund seines codierenden Gens AT1G54410 (roter Pfeil am Stammbaum und roter Punkt unter „Your Input“) und des koexprimierten Gens AT1G13930 (grüner Pfeil am Stammbaum und grüner Punkt unter „Predicted Functional Partners“). Homologien mit anderen Genprodukten werden anhand eines roten Quadrates in der Zeile der Art und der Spalte des Gens dargestellt. Die Skala reicht von Weiß (keine Homologie) bis Dunkelrot (100%-ige Übereinstimmung). Erstellt mittels String 9.0 [155, 156].

Auch wurden die bekannten Interaktionen des Genproduktes von AT1G54410 mittels String 9.0 evaluiert. Eine Vielzahl der gefundenen Interaktionspartner lassen sich auf Textmining-Ergebnisse zurückführen, nur für vier Partner wurde eine Koexpression festgestellt (**Abbildung 37**). Die Interaktionspartner können in Gruppen unterteilt werden. Die wichtigsten Gruppen sind die

Salztoleranz-assoziierten Proteine (vgl. **Abbildung 37** STO und AT1G13930), Hitzeschockproteine (HSP17.4 und AT1G54050) und Proteine, die für eine normalphysiologische Funktion notwendig sind (KOB1 vgl. **Abbildung 37** KOB1).

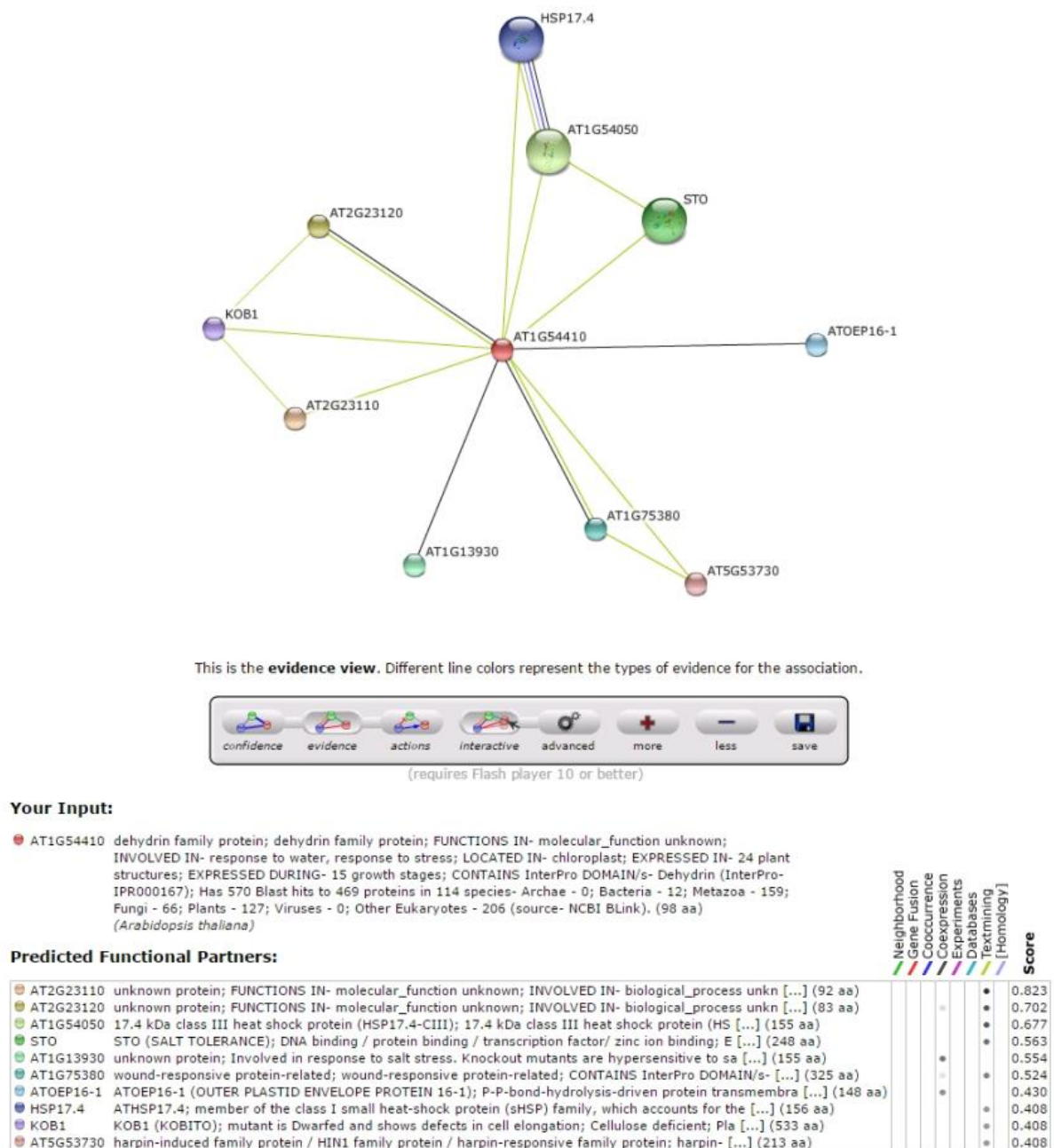


Abbildung 37 Übersicht über Interaktionen des Genproduktes von AT1G4410 (AtHIRD11) mit den Genprodukten verschiedener Gene. Interaktionen werden als verbindende Linien zwischen den Partnern angezeigt. Die Farbe der Linie gibt den Evidenzgrad wieder (grün = „Textmining“; blau = gemeinsames Auftreten; schwarz = coexprimiert). Erstellt mit String 9.0 [155, 156].

Nichtsdestotrotz, konnten die für andere Dehydrine gefundenen Interaktionen mit Phospholipiden, Ca^{2+} -Ionen, dem Cytoskelett und Nukleinsäuren (**Abbildung 38**), für AtHIRD11 nicht in den Datenbank mittels String 9.0 gefunden werden [149].

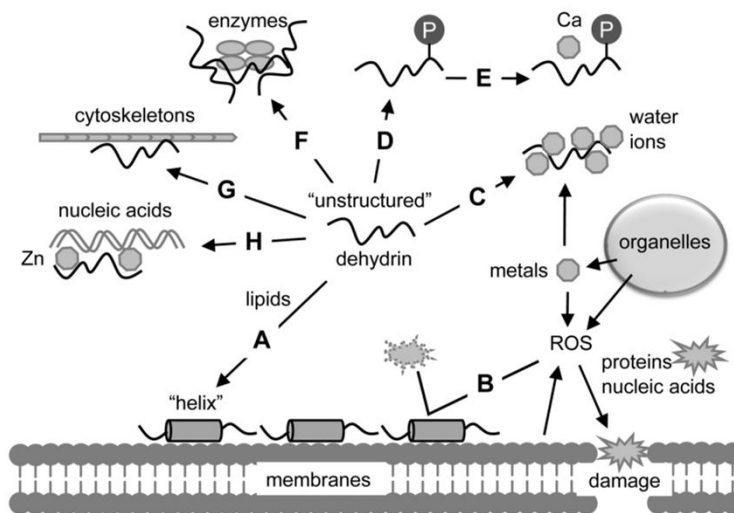


Abbildung 38 Übersicht über die experimentell bestätigten Funktionen von Dehydrinen nach Hara *et al.* [149].

A: Phospholipidbindung; B: Radikalfängerfunktion; C: binden von Wasser und Ionen;
D: Phosphorylierbarkeit; E: Bindung von Ca^{2+} -Ionen; F: Schutz von Enzymen; G: Bindung
an das Cytoskelett; H: Zn^{2+} -vermittelte Bindung an Nukleinsäuren.

Lediglich die Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies, das Metallbindungsvermögen, die Schutzfunktion für Enzyme und die Möglichkeit zur Phosphorylierung wurden bereits in einigen Veröffentlichungen beschrieben [148, 149, 152].

7.2. Ergebnisse aus Interaktionsstudien

Die in der Literatur beschriebenen Interaktionsstudien für AtHIRD11 beschäftigten sich mit den Metallionenbindungseigenschaften des Proteins. Sie hatten als Ziel, die Detektion einer strukturellen Veränderung mittels CD-Analyse, das Bindungsvermögen von Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} und Cd^{2+} mittels Affinitätschromatographie zu bestimmen, die AtHIRD11-abhängige Abnahme von ROS in Gegenwart von Cu^{2+} -Ionen und die enzymprotektive Wirkung von AtHIRD11 in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen zu untersuchen [148, 149, 152].

7.2.1. Affinitätschromatographische und zirkulardichroistische Ergebnisse für AtHIRD11

Hara *et al.* konnten mittels Ionenmobilitätsaffinitätschromatographie (IMAC) zeigen, dass das Dehydrin AtHIRD11 Co^{2+} -, Ni^{2+} -, Cu^{2+} -, Zn^{2+} - Ionen binden kann. Die Fähigkeit Mg^{2+} -, Ca^{2+} -, Mn^{2+} -, Cd^{2+} -Ionen an die unphosphorylierte Form des Proteins zu binden, konnte nicht festgestellt werden [148]. Es wurden für die Komplexe aus bindenden Metallionen und AtHIRD11 sowohl die Dissoziationskonstanten K_d für hochaffine und weniger affine Bindungsstellen als auch die maximale Bindungskapazität B_{max} bestimmt (**Abbildung 39**).

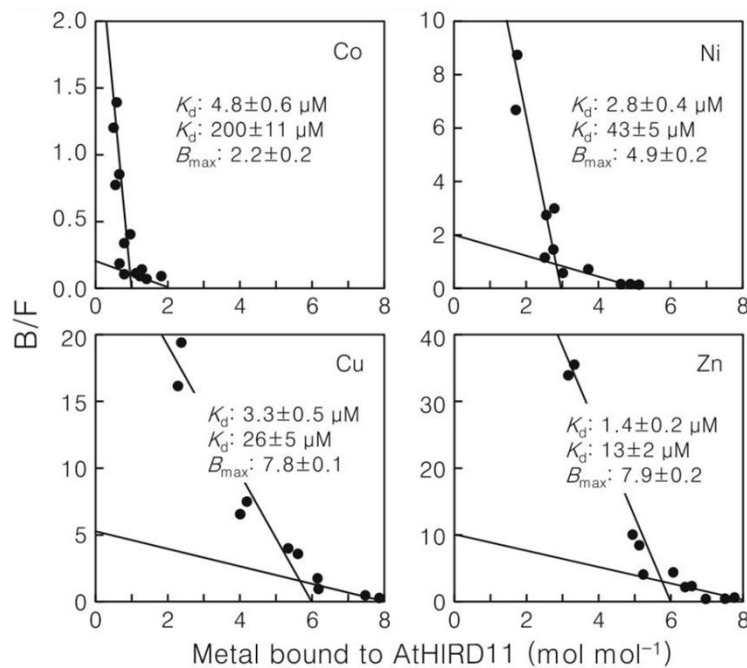


Abbildung 39 Übersicht über Dissoziationskonstanten K_d für nieder- (unterer K_d -Wert) und hochaffingebundene (oberer K_d -Wert) für die Metallionen Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} an unphosphoryliertem AtHIRD11 sowie die maximale Anzahl an gebundenen Ionen pro Molekül AtHIRD11 B_{\max} nach Hara *et al.* [148] in Scatchard-Diagrammen. Hierbei wird die Konzentration der gebundenen Ionen (B) gegen die Konzentration der freien (F) aufgetragen.

Konformationsänderungen konnten von Hara *et al.* mittels Bindung von Cu^{2+} -Ionen durch eine Abflachung des negativen Peaks bei 200 nm im Zirkulardichroismusspektrum gezeigt werden. Die flacheren Peaks in **Abbildung 40** zeigen eine konzentrationsabhängige Abnahme der ungeordneten Struktur durch steigende Cu^{2+} -Ionenkonzentrationen an [152].

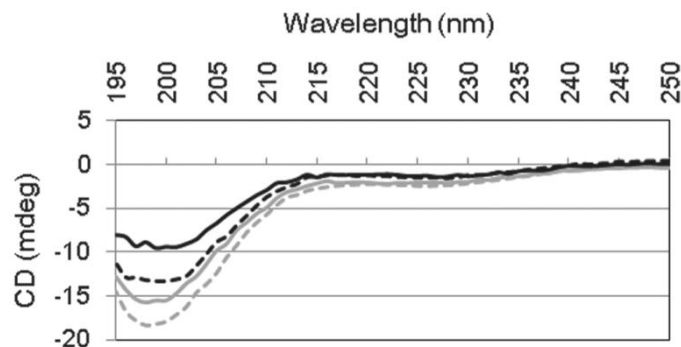


Abbildung 40 CD-Spektrum von 4,6 $\mu\text{mol/L}$ AtHIRD11-Lösung in Anwesenheit 0 $\mu\text{mol/L}$ (graue gestrichelte Linie), 2,3 $\mu\text{mol/L}$ (graue durchgezogene Linie), 23 $\mu\text{mol/L}$ (schwarze gestrichelte Linie) und 230 $\mu\text{mol/L}$ (schwarze durchgezogene Linie) Cu^{2+} -Ionen nach Hara *et al.* [157]. Die Änderung des Spektrums im Bereich um 200 nm weist auf Verringerung der ungeordneten Struktur hin.

7.2.2. Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophoretische Ergebnisse für AtHIRD11

Die mittels Affinitätschromatographie gewonnenen Bindungsergebnisse wurden durch die hierzu orthogonale Technik ACE überprüft. Dabei wurden auch zusätzliche Ionen in die Untersuchungen mit einbezogen. Es wurden Ionenkonzentrationen von 250 $\mu\text{mol/L}$ und 500 $\mu\text{mol/L}$ bzw. 25 $\mu\text{mol/L}$ und

50 $\mu\text{mol/L}$ für Zn^{2+} verwendet. Bei den untersuchten Metallionen handelt es sich um Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} . Als EOF-Marker wurde in diesen Untersuchungen eine 50 $\mu\text{mol/L}$ Acetanilidlösung eingesetzt.

Aufgrund der sieben reproduzierbaren Peaks in den Elektropherogrammen (**Abbildung 41**) wurde zusätzlich das Proteinmaterial auf nieder- bzw. hochmolekulare Verunreinigungen aus der Aufreinigung des Proteins nach biotechnologischer Herstellung bzw. Abbauprodukte durch die Lagerung mittels CGE untersucht (**Abbildung 42**).

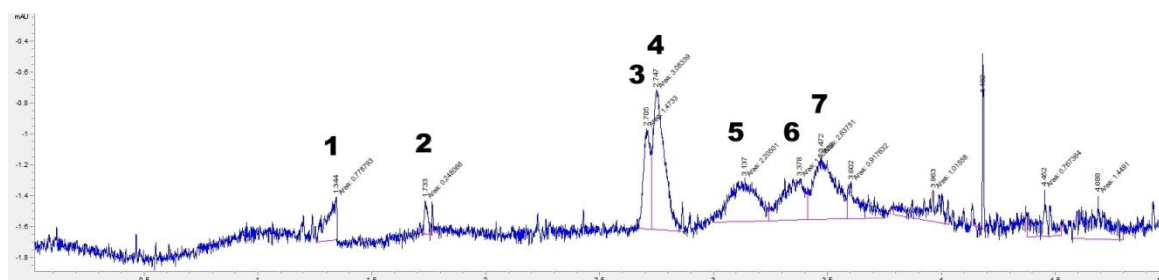


Abbildung 41 Elektropherogramm der AtHIRD11-Probe in 30 mmol/L TRIS-Puffer. Reproduzierbare Peaks wurden nach ihrem zeitlichen Auftreten von 1 bis 7 nummeriert.

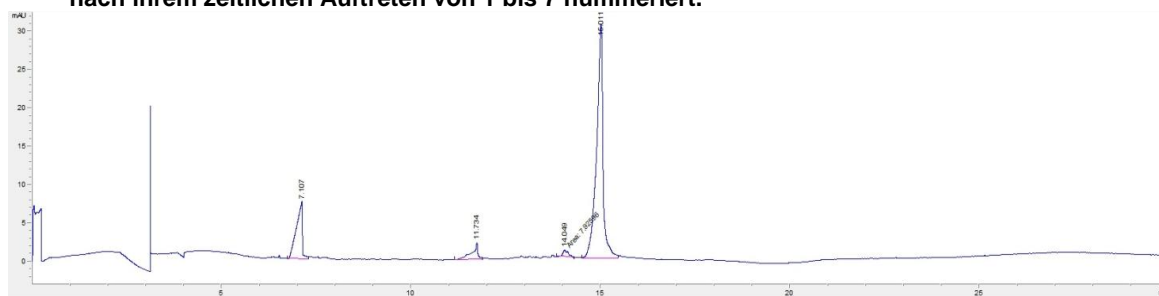


Abbildung 42 Elektropherogramm der CGE-Untersuchung. Peaks vor Min 8 können dem SDS-Gel zugeordnet werden. Der Hauptpeak bei Min 15 entspricht dem Protein AtHIRD11, die beiden anderen können niedrigmolekularen Verunreinigungen zugeordnet werden.

Die CGE-Elektropherogramme wiesen, neben den gelspezifischen Peaks vor der 8. Minute, drei Peaks auf. Die beiden Peaks bei 11,73 min und 14,04 min können, aufgrund ihrer geringen Fläche und der kurzen Zeit bis zur Detektion, als nicht näher spezifizierte Verunreinigungen betrachtet werden. Dies lässt sich mit der kurzen Analysenzeit und die damit verbundenen niedrigen molekularen Masse begründen. Daher können im ACE-Experiment die Peaks nicht eindeutig nur dem intakten AtHIRD11 zugeordnet werden.

Die Lage der Peaks 3 und 4 in den ACE-Elektropherogramme lässt eine gleichzeitige Verwendung eines EOF-Markers in der Probe nicht zu, da der EOF-Markerpeak diese beiden Peaks überdeckt (vgl. **Abbildung 42** und **Abbildung 43**). Daher wurde ein Versuchsdesign mit alternierender Injektion von Marker und Protein in aufeinanderfolgenden Separationen gewählt.

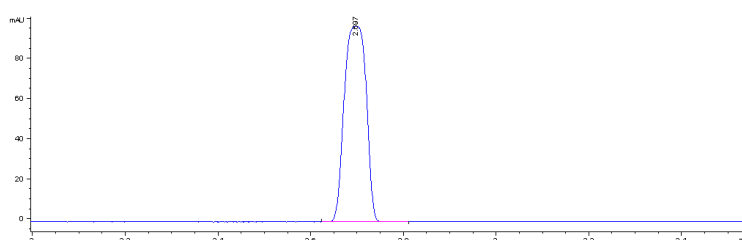


Abbildung 43 Beispiel für die Peakform und Migrationszeit des EOF-Markers Acetanilid in Anwesenheit von 250 $\mu\text{mol/L}$ Mg^{2+} im Puffer.

Eine weitere Auffälligkeit in **Abbildung 41** besteht auch in der Peakform. Während die Peaks 1-4 eher schmal mit einer leicht identifizierbaren Spitze sind, sind die Peaks 5-7 breiter und besitzen meist ein breites Maximum. Die Spezies, die sich hinter dem 1. Peak verbirgt zeigte eine starke Änderung des Größen-Ladungs-Verhältnisses bei allen Metallionen und Konzentrationen mit Ausnahme der 50 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} -Lösung. Auch die Lage des Peaks, deutlich vor dem Zeitfensters des EOF-Markers Acetanilid, lässt darauf schließen, dass es sich um einen hochgeladenen und/oder kleinen Probenbestandteil handelt. Peak 2 zeigte neben einer Verbreiterung, ähnlich wie die Peaks 5-7, die mit einer schlechteren Detektierbarkeit unter Metallioneneinfluss einhergeht (**Abbildung 44**), auch eine starke Variabilität in der Migrationszeit.

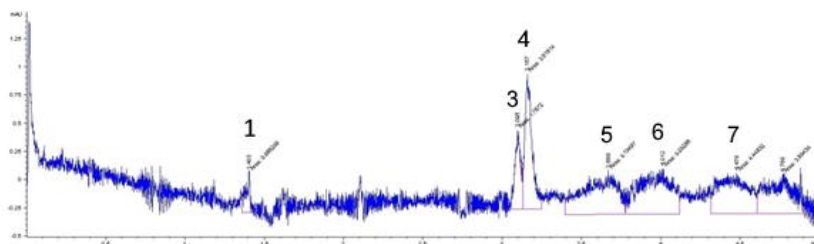


Abbildung 44 Beispiel für Veränderungen durch Metallioneninteraktionen anhand von 250 $\mu\text{mol/L}$ Mn^{2+} im BGE. Peak 2 ist hier nicht mehr zu erkennen und die Peaks 5-7 treten flacher und verbreitert auf.

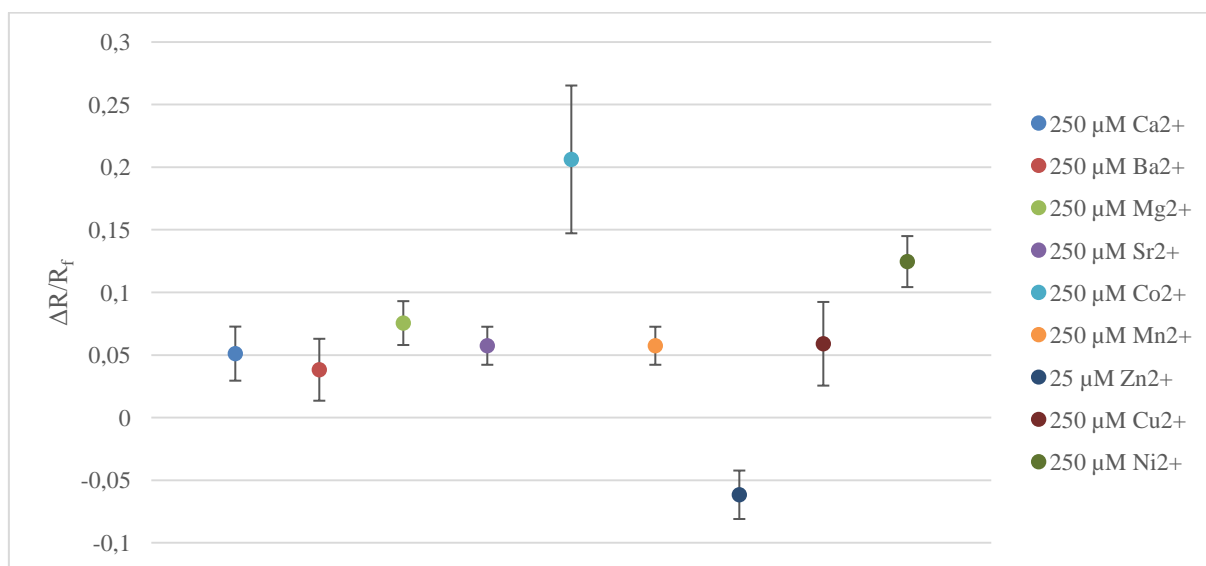


Abbildung 45 Überblick über die $\Delta R/R_f$ -Werte für die Interaktion zwischen dem Probenbestandteil repräsentiert durch den 1. Peak und den verschiedenen Metallionen bei einer Konzentration von 250 $\mu\text{mol/L}$ Metallion bzw. 25 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} als Beispiel für eine graphische Auswertung der Werte.

Die Peaks 3 und 4 zeigen keine signifikante Änderung in ihren $\Delta R/R_f$ -Werten (**Tabelle 5** und **Tabelle 6**). Dies kann einfach anhand ihrer Lage erklärt werden, da, wie schon beschrieben, beide Peaks im Bereich des EOF-Markers migrieren und daher ungeladen vorliegen. Für die Koordination von Metallionen ist, wie bereits in Kapitel 3.3 beschrieben, ein Elektronenpaardonator notwendig, da aber die meisten Carbonsäure-Funktionen protoniert vorliegen, können sie kein Elektronenpaar zur Verfügung stellen, ohne dass es zu einer starken Annäherung und damit abstoßenden elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem Kation und dem Proton der Carbonsäure kommt. Selbst wenn man unterstellt, dass zwei Carbonsäurefunktionen in geeignetem Abstand für eine koordinative Bindung von divalenten Metallkationen zur Verfügung stehen und tatsächlich deprotoniert werden, ändert sich die

Ladung des Gesamtkomplexes nicht und die Masse bzw. auch der Stoke's Radius wird nur unwesentlich erhöht. Somit kann die Bindung mit ACE nicht detektiert werden.

Die Ergebnisse für die Peaks 5-7 spiegeln am besten die bisherigen Ergebnisse, die Hara *et al.* beschrieben haben, wieder [148]. Die $\Delta R/R_f$ -Werte zeigen hier, wie die Ergebnisse der IMAC-Untersuchungen, Interaktionen zwischen AtHIRD11 und Zn^{2+} . Die Interaktionen mit Cu^{2+} und Ni^{2+} weisen starke Drifts der Migrationszeiten auf, der mit Veränderungen an der Kapillarinnenwand einhergingen und nach längerem Spülen mit 0,1 M EDTA in 0,1 M NaOH-Lösung teilweise verbessert werden konnten. Dies führte zu den breiten Konfidenzintervallen, die bei 250 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} und bei beiden Ni^{2+} -Konzentrationen den Null-Wert einschließen (vgl. **Tabelle 5** und **Tabelle 6**). Bei den Co^{2+} -Experimenten konnten in den meisten Fällen nur die Peaks 3 und 4 eindeutig erkannt werden. Die Interaktion von Mg^{2+} mit den Spezies, die durch die Peaks 6 und 7 repräsentiert werden, lässt sich durch die Ähnlichkeit zwischen Zn^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen erklären, die in Kapitel 3.4. beschrieben wurden. Das Paradoxon, dass die Komplexe aus AtHIRD11 und den divalenten Übergangsmetallkationen negativer sind als das Protein alleine, lässt sich durch eine zusätzliche Koordination der negativ geladenen Chlorid-Ionen aus dem Puffer an vakanten Ligandenbindungsstellen am zentralen Übergangsmetallion erklären. Dieses Verhalten ist nach dem HSAB-Konzept für die untersuchten Erdalkalimetallionen untypisch, jedoch für Kationen der Übergangsmetalle nicht unüblich.

Tabelle 5 Übersicht über Änderung der $\Delta R/R_i$ -Werte für die einzelnen Peaks der AtHIRD11-Probe bei Anwesenheit von 250 $\mu\text{mol/L}$ der untersuchten Metallionen bzw. 25 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} . Die angegebene Bereiche bilden die Konfidenzintervalle für einen α -Fehler von 5 %. Werte, die keine Änderung des $\Delta R/R_i$ -Werte anzeigen, sind rot markiert. Werte, die aufgrund einer zu geringen Anzahl (in < 6 von 10 Elektropherogrammen vorhanden) an auswertbaren Peaks berechnet wurden, sind mit (*) gekennzeichnet.

Metallion	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak7
Ca^{2+}	0,0295	-0,1095	-0,0390	-0,0440	-0,0559	-0,1099	-0,0986
	–	–	–	–	–	–	–
	0,0727	0,4793	0,0363	0,0320	0,0511	0,1496	0,1661
Ba^{2+}	0,0135	0,0519	-0,0415	-0,0599	-0,0718	-0,0546	-0,0698
	–	–	–	–	–	–	–
	0,0630	0,4237	-0,0445	0,0645	0,1692	0,1129	0,0976
Mg^{2+}	0,0580	-0,0147	-0,0169	-0,0312	-0,0099	0,0234	0,0244
	–	–	–	–	–	–	–
	0,0930	0,6846	0,0413	0,0382	0,0618	0,1117	0,1568
Sr^{2+}	0,0422	0,1732	-0,0361	-0,0354	-0,0996	-0,0507	-0,0507
	–	–	–	–	–	–	–
	0,0726	0,3678	0,0576	0,0230	0,0053	0,0264	0,0264
Co^{2+}	0,1472	0,0401	-0,0945	-0,0733	-0,0635	-0,0262	-0,0190
	–	–	–	–	–	–	–
	0,2652	0,3818 (*)	0,0290 (*)	0,0286	0,1314 (*)	0,1062	0,1096 (*)
Mn^{2+}	0,0422	0,1732	-0,0361	-0,0354	-0,0996	-0,0507	-0,0929
	–	–	–	–	–	–	–
	0,0726	0,3678	0,0576	0,0296	0,0053	0,0264	0,0224
Zn^{2+}	-0,0809	-0,1882	-0,1660	-0,1964	-0,2340	-0,2648	-0,2369
	–	–	–	–	–	–	–
	-0,0422	0,3171	-0,0875	-0,1037	-0,1417	-0,1474	-0,0868
Cu^{2+}	0,0256	-0,0997	-0,0357	-0,0383	-0,0393	-0,0495	-0,1488
	–	–	–	–	–	–	–
	0,0924	0,0825	0,0519	0,0519	0,1208	0,0797	0,0893
Ni^{2+}	0,1043	–	-0,0733	-0,0739	-0,0297	-0,0821	-0,1512
	–	–	–	–	–	–	–
	0,1450	–	0,0407	0,0551	0,1119	0,1099	0,1599

Tabelle 6 Übersicht über Änderung der $\Delta R/R_f$ -Werte für die einzelnen Peaks der AtHIRD11-Probe bei Anwesenheit von 500 $\mu\text{mol/L}$ der untersuchten Metallionen bzw. 50 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} . Die angegebenen Bereiche bilden die Konfidenzintervalle für einen α -Fehler von 5 %. Werte, die keine Änderung des $\Delta R/R_f$ -Werte anzeigen, sind rot markiert. Werte, die aufgrund einer zu geringen Anzahl an auswertbaren Peaks berechnet wurden, sind mit (*) gekennzeichnet.

Metallion	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak7
Ca^{2+}	0,0916 – 0,1374	0,5071 – 0,6247	-0,0628 – 0,1211	-0,0750 – 0,1270	0,0434 – 0,1342	0,0376 – 0,1661	0,0091 – 0,1396
Ba^{2+}	0,0377 – 0,1042	0,2124 – 0,5074 (*)	-0,0575 – 0,0550	-0,0630 – 0,0528	-0,0644 – 0,1784	-0,1167 – 0,1828 (*)	-0,1096 – 0,1127
Mg^{2+}	0,0986 – 0,1490	-0,0987 – 0,3890 (*)	-0,0399 – 0,0444	-0,0504 – 0,0375	-0,0412 – 0,0375	0,0109 – 0,1307	-0,0173 – 0,1733
Sr^{2+}	0,1180 – 0,1474	0,2959 – 0,4930	-0,0199 – 0,0412	–	0,0360 – 0,1024 (*)	-0,0455 – 0,0201	-0,0069 – 0,0602
Co^{2+}	0,0989 – 0,1393	0,1388 – 0,3610 (*)	-0,0509 – 0,0313 (*)	-0,0506 – 0,0633 (*)	-0,1028 – 0,0201 (*)	-0,2492 – 0,1462 (*)	-0,1824 – 0,0875 (*)
Mn^{2+}	0,1426 – 0,1705	0,3416 – 0,6062	0,0014 – 0,0565	–	0,0610 – 0,2398 (*)	-0,0039 – 0,0734	0,0122 – 0,1322
Zn^{2+}	-0,0057 – 0,0493	-0,0382 – 0,1754	-0,0647 – 0,0488	-0,0703 – 0,0765	-0,1078 – 0,0042	-0,1673 – -0,0471	-0,1787 – -0,0259
Cu^{2+}	0,0686 – 0,2582	-0,0030 – 0,4161	-0,0181 – 0,1336	-0,0299 – 0,1173	0,0455 – 0,2640	0,0468 – 0,2975	0,0553 – 0,3505
Ni^{2+}	0,3672 – 0,5042	–	-0,0536 – 0,0313	-0,0701 – 0,0192	-0,1440 – 0,0596 (*)	-0,1696 – 0,0329 (*)	-0,1696 – 0,0329 (*)

7.3. Erstellung und Verfeinerung eines Homologie-Modells

Die bereits veröffentlichten Untersuchungsergebnisse und die Ergebnisse aus den ACE-Experimenten ergeben einen ersten Eindruck über die Eigenschaften und mögliche Funktionen von AtHIRD11. Allerdings findet man keine Veröffentlichungen zur Struktur des Proteins und daher kann man die Ergebnisse nicht anhand eines Modells erklären (Stand: 28.07.2016). Um dies zu erreichen wurde das Protein AtHIRD11 mittels Homologie-Modellierung an die mit MOE gefundene strukturell verwandte Histidin-Phosphotransferase-Domäne (pdb: 3IQ7) des *Escherichia coli* Proteins barA angepasst [158].

Die Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zwischen den beiden Proteinen beträgt hierbei ca. 30 %. Die Verwendung eines weiteren Programms zur Homologiemodellierung (Phyre2), zeigte nur eine 14 %ige Übereinstimmung in der Sequenz (ca. 14 Aminosäuren) mit der Aktivierungsdomäne des

Transkriptionsfaktors MotA. Dies geschah mit einer größeren Unsicherheit (Konfidenzwert von 4,4 %) und wurde gesondert in Form der D1-Domäne untersucht [123].

Das Modell von AtHIRD11 entsprach in weiten Teilen der barA-Vorlage (**Abbildung 48**). Noch erkennbare Abweichungen von den üblichen Bindungswinkeln und -längen (**Abbildung 46** und **Abbildung 47**) wurden durch molekülmechanische Energieminimierung mittels GROMACS unter Verwendung des GROMOS53a6ff-Krafftfeldes korrigiert [159].

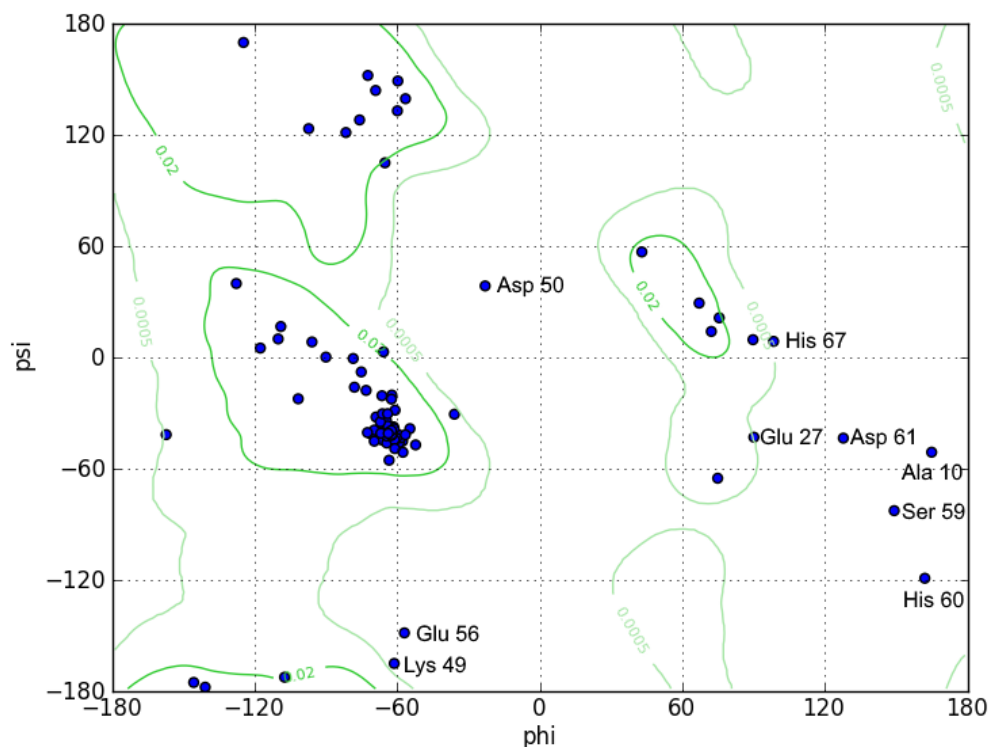


Abbildung 46 Ramachandran-Plot für AtHIRD11 nach der Homologiemodellierung mit 9 Aminosäuren im „nicht-erlaubten“ Bereich.

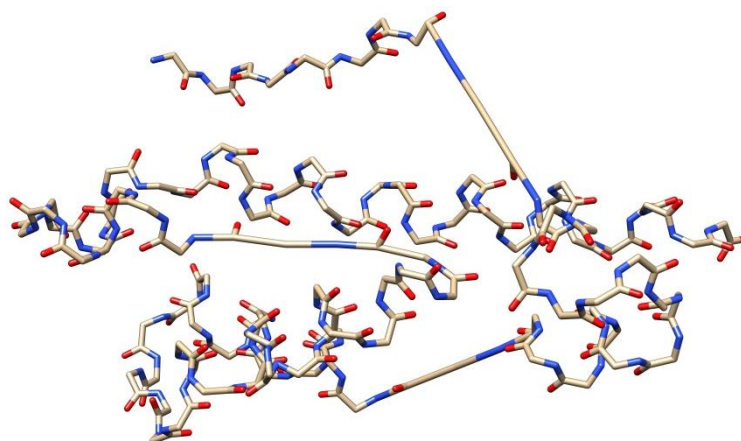


Abbildung 47 Peptidrückgrat von AtHIRD11 nach der Homologiemodellierung mit zu langen Bindungen und ungünstigen Bindungswinkeln. Ausgangsstruktur für nachfolgende Optimierungen und Berechnungen. Sauerstoffatome werden rot und Stickstoffatome blau dargestellt.

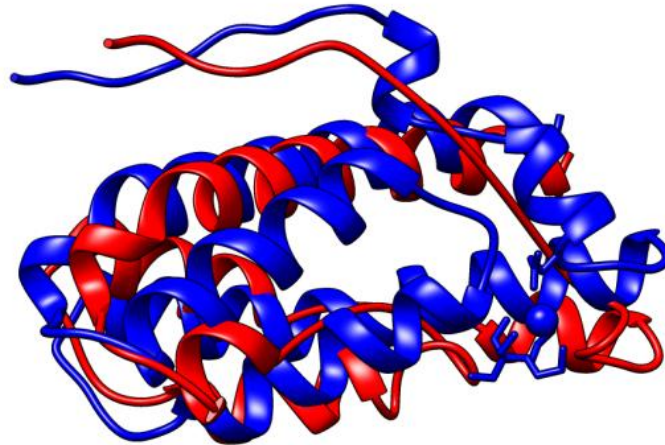


Abbildung 48 Überlagerung des Modells von AtHIRD11 (rot) und der Vorlage barA (blau).

Auch konnte die Qualität des Modellierungsergebnisses erneut mit Hilfe eines Ramachandran-Plots und einer visuellen Begutachtung bewertet werden (**Abbildung 49** und **Abbildung 50**). Der Vergleich der beiden Ramachandran-Plots (**Abbildung 46** und **Abbildung 49**) zeigt, dass zwar jeweils 9 Aminosäuren im „Nicht-erlaubten“-Bereich liegen, aber durch die Optimierung diese näher an den erlaubten Bereichen herangerückt sind. Die gestreckten peptidischen Bindungen im Proteinerückgrat konnten auf übliche Längen reduziert werden (vgl. **Abbildung 50**).

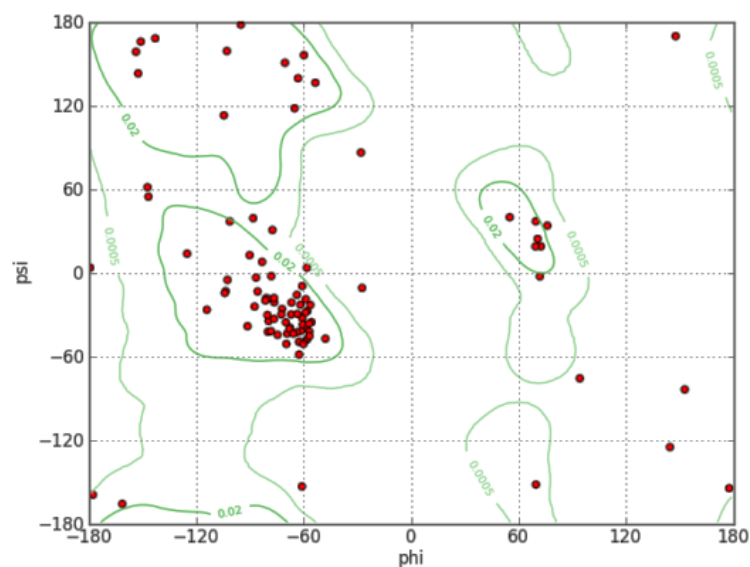


Abbildung 49 Ramachandran-Plot des molekülmechanisch energieminierten AtHIRD11 erstellt mit Hilfe von Chimera 1.10.2.

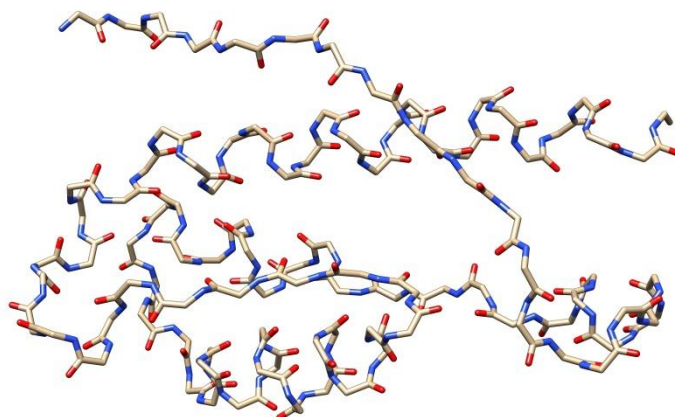


Abbildung 50 Peptidrückgrat von AtHIRD11 nach Optimierung mittels GROMOS53a6ff-Kraftfeld.

Eine starre Struktur mit einem globalen Minimum ist für AtHIRD11, aufgrund seiner Zugehörigkeit zu den IDPs, nicht zu erwarten. Vielmehr kann AtHIRD11 bei den weiteren MD-Simulationsuntersuchungen verschiedene Konformere annehmen und dabei auch ungünstige Verhältnisse der Winkel ϕ und ψ zueinander durchlaufen. Daher ist eine Lage von ca. 10 % der Aminosäuren im Ramachandran-Plot im „Nicht-erlaubten“-Bereich akzeptabel für die weiteren Modellierungsschritte. Für die Erstellung des Cu^{2+} -AtHIRD11-Modells ist die richtige Distanz möglicher komplexierenden Aminosäuren zueinander von größerer Bedeutung.

7.3.1 Das Kupfer(II)-AtHIRD11-Modell

Der Cu^{2+} -AtHIRD11-Komplex ist, aufgrund seiner Relevanz für das antioxidative System von *A. thaliana*, der am besten untersuchte Kation-AtHIRD11-Komplex [148, 152, 157, 160]. Der für die antioxidative Wirkung verantwortliche Mechanismus konnte bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Es ist lediglich bekannt, dass diese Funktion an das Vorhandensein von *L*-Histidylresten im Protein geknüpft ist [152]. Eine visuelle Darstellung des Cu^{2+} -AtHIRD11-Komplexes könnte für die Begründung dieses Zusammenhangs behilflich sein. Unter Berücksichtigung der Data-mining-Ergebnisse von Harding *et al.* und Zheng *et al.* kommen nur *L*-Histidyl-, *L*-Glutamyl- und *L*-Aspartylreste für die Komplexierung der Cu^{2+} -Ionen in Frage [65, 66]. Bei genauerer Betrachtung des erstellten Modells fällt auf, dass diese Reste in einigen Proteinregionen gehäuft auftreten (vgl. **Abbildung 51**).

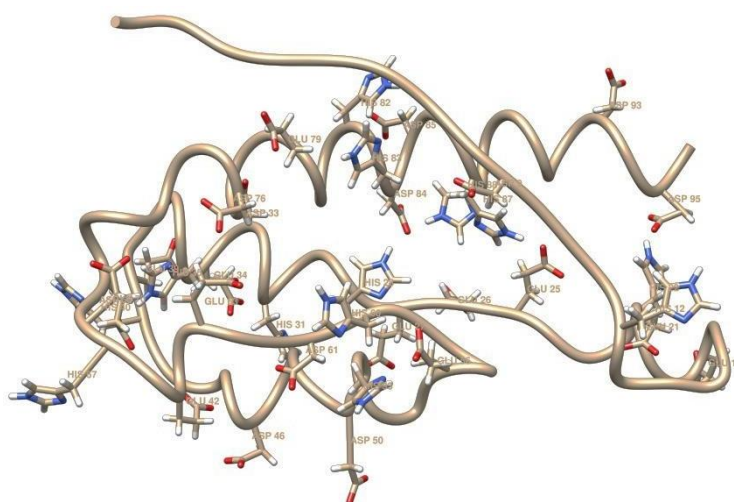


Abbildung 51 Schleifenmodell von AtHIRD11 mit nummerierten *L*-Aspartyl- (Asp), *L*-Glutamyl- (Glu) und *L*-Histidylseitenkettenresten (His). Die Nummerierung erfolgt ausgehend vom N-Terminus. Das Modell zeigt die räumliche Ballung dieser Seitenketten in einigen Regionen des Proteins.

Diese Regionen wurden systematisch nacheinander zu ihrem Komplexbildungsverhalten in Gegenwart von Cu^{2+} -Ionen untersucht und anschließend die Stabilität, Geometrie sowie die Abweichung von der idealen Geometrie der gebildeten Komplexe bestimmt (**Tabelle 7**).

Tabelle 7 Übersicht über alle bestimmten Cu^{2+} -Ionenbindungsstellen, ihre Komplexbildungspartner (im Dreibuchstabencode mit Nummer des Aminosäurerests), die Komplexgeometrie und ihre RMSD-Werte.

	1. Cu^{2+}	2. Cu^{2+}	3. Cu^{2+}	4. Cu^{2+}	5. Cu^{2+}	6. Cu^{2+}	7. Cu^{2+}
1. Ligand	H_2O	HIS 88	LYS 58	H_2O	H_2O	SER 90	GLU 39 (Peptid-sauerstoff)
2. Ligand	SER 59	H_2O	HIS 87	HIS 31	GLU 79 (Carboxyl-sauerstoff)	HIS 82 (Peptid-sauerstoff)	H_2O
3. Ligand	HIS 53	SER 96	ASP 84	GLU 42 (Carboxyl-sauerstoff)	GLU 79 (Carboxyl-sauerstoff)	GLY 86	HIS 40
4. Ligand	ASP 9	GLU 25	GLU 26	GLU 42 (Peptid-sauerstoff)	GLU 63 (Carboxyl-sauerstoff)	HIS 82 (Imidazol-stickstoff)	GLU 39 (Carboxyl-sauerstoff)
Geometrie	Quadratisch-planar	Quadratisch-planar	Quadratisch-planar	Quadratisch-planar	Quadratisch-planar	Quadratisch-planar	Quadratisch-planar
RMSD [Å]	0.477	0.402	0.409	0.458	0.661	0.573	0.296

Der modellierte Komplex mit 7 Cu^{2+} -Ionen (**Abbildung 53**) wies auch nach zweifacher Wiederholung einer MD-Simulationen über 2 ns nur 6 stabile Bindungsstellen auf. Die Cu^{2+} -Ionen dissoziierten nach 0,867 ns bzw. 1,951 ns ab. Die Gesamtenergie des simulierten Systems (AtHIRD11 mit 7 Cu^{2+} -Ionen und Wassermoleküle) blieb nach einem Drift innerhalb der ersten 100 ps stabil und fluktuierte nur marginal (vgl. **Abbildung 54**). Anschließend wurde die Stabilität des Komplexes über 14 ns getestet.

Dieser Zeitraum bildet nicht nur Veränderungen in den Bindungslängen von Molekülbindungen ab, sondern auch teilweise Änderungen in der Faltung der Sekundärstruktur (vgl. **Abbildung 52**) [161].

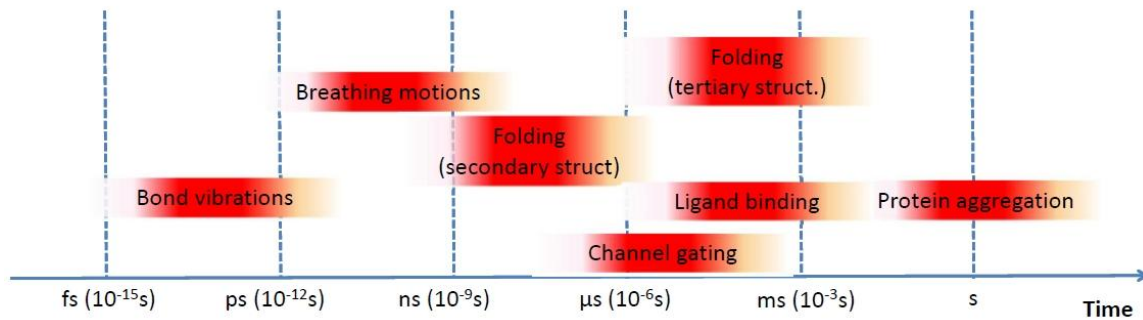


Abbildung 52 Zeitskala für (v. l.) Schwingung von chemischen Bindungen, "Atembewegungen", Faltung der Sekundärstruktur, Öffnung von (Ionen)Kanälen, Bindung von Liganden, Faltung der Tertiärstruktur und Proteinaggregation nach Branduardi [161].

Hierbei fiel auf, dass trotz annähernd gleichbleibender Gesamtenergie des Systems (**Abbildung 55**), der Komplex teilweise dissoziiert (**Abbildung 56** und **Abbildung 57**). Die erste Stufe der Dissoziation findet in diesem Fall bereits nach 0,288 ns statt. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die beiden vorangegangenen Simulationen, trotz der gleichen Ausgangsstruktur keine Anzeichen einer Dissoziation. Die zweite Dissoziationsstufe, die ab 1,349 ns in der 3. Simulation auftrat, zeichnete sich in den vorangegangenen Simulationen nicht ab, obwohl dieser Zeitpunkt ebenfalls abgedeckt wurde.

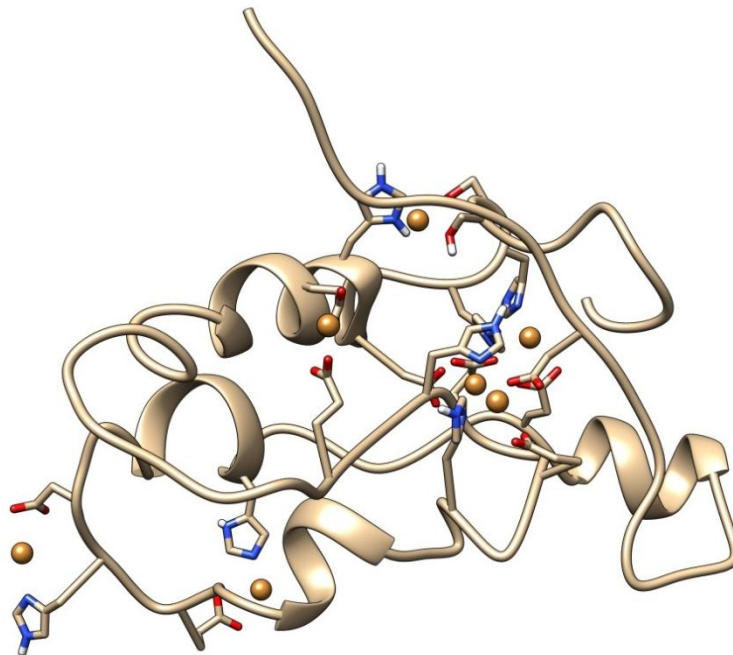


Abbildung 53 AtHIRD11-Cu²⁺-Komplex mit 7 koordinierten Cu²⁺-Ionen in der Schleifenmodell Darstellung nach Hara *et al.* [152]. Bindende Aminosäureseitenkettenreste werden explizit mit Sauerstoff- (rot), Stickstoff- (blau) und Wasserstoffatomen (weiß) dargestellt. Cu²⁺-Ionen werden als orangefarbene Kugeln dargestellt.

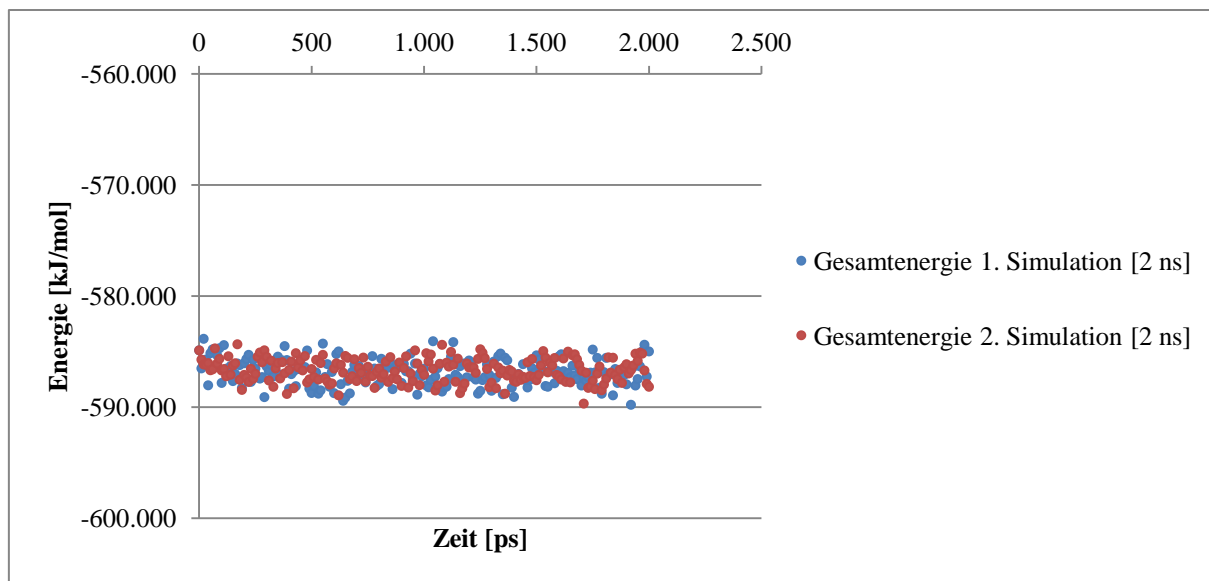


Abbildung 54 Zeitlicher Verlauf der Gesamtenergie des Systems bestehend aus AtHIRD11, 7 Cu^{2+} -Ionen und Wassermolekülen für die beiden Simulationen über einen Zeitraum von 2 ns.

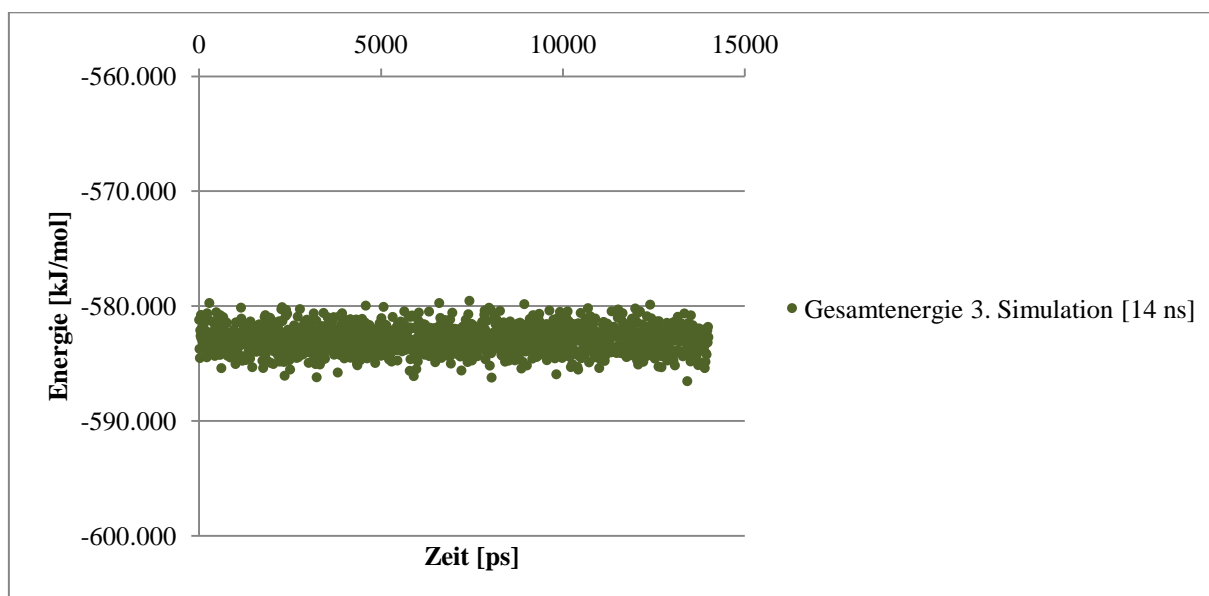


Abbildung 55 Zeitlicher Verlauf der Gesamtenergie des Systems bestehend aus AtHIRD11, 7 Cu^{2+} -Ionen und Wassermolekülen für die Simulation über einen Zeitraum von 14 ns.

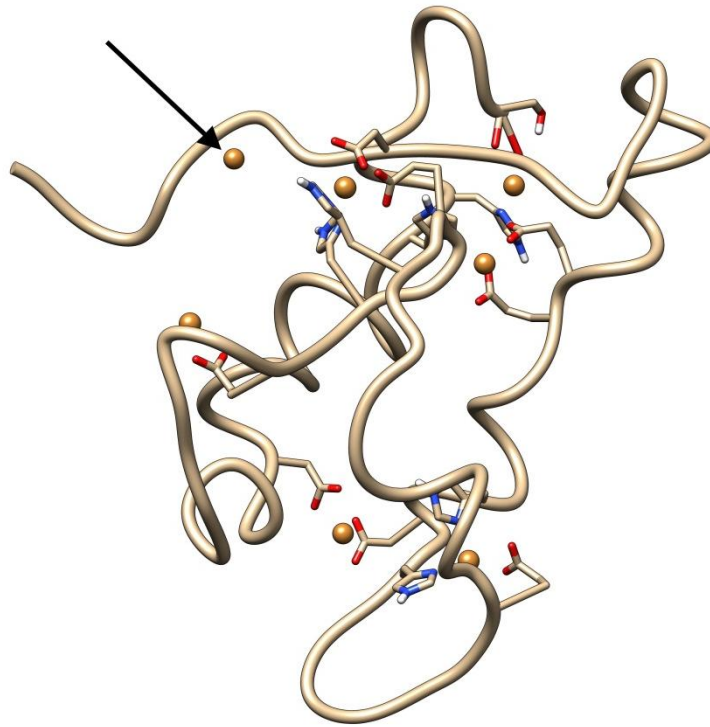


Abbildung 56 AtHIRD11- Cu^{2+} -Komplex mit 6 gebundenen Cu^{2+} -Ionen nach 0,288 ns. Das Cu^{2+} -Ion oben links (markiert mit einem schwarzen Pfeil) weist keine Bindung mehr mit dem Protein auf.

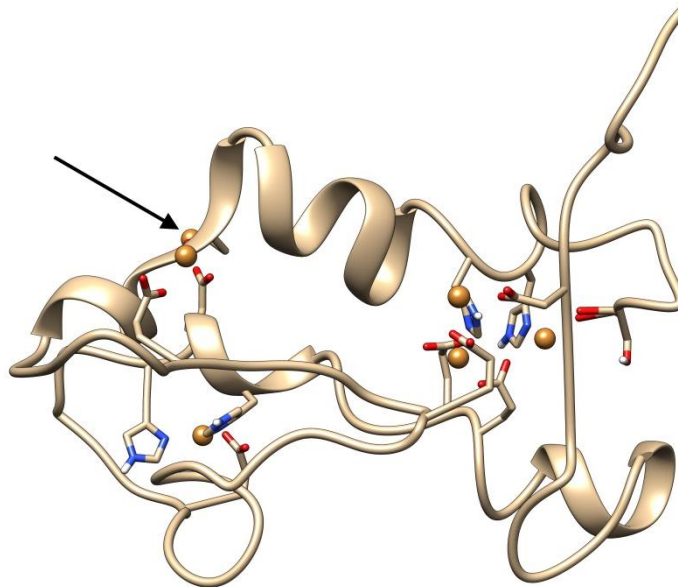


Abbildung 57 AtHIRD11- Cu^{2+} -Komplex mit 5 gebundenen Cu^{2+} -Ionen nach 1,349 ns. Das Cu^{2+} -Ion oben links hinter dem Protein (markiert mit einem schwarzer Pfeil) interagiert nur über einen Ser-Hydroxylsauerstoff.

Die MD-Simulationen zeigen, dass mehrere Konformationen innerhalb des simulierten Zeitraumes vorliegen und dass keine dieser Konformationen ein zweites Mal „besucht“ wurde (**Abbildung 58**). Da jede Konformation zumindest einen geringen Unterschied zu allen anderen aufweist (geringer RMSD-Wert in Bezug auf Startstruktur), werden ähnliche Strukturen (geringer Unterschied in RMSD-Werten) in „Cluster“ eingeordnet. Somit reduziert sich die Anzahl der Konformere drastisch (von 14.001 auf ca. 55). Der Clusterbildungsalgorithmus zeigt hier allerdings seine Grenzen auf, da z.B. die beiden

Dissoziationsstufen bei 0,288 ns und 1,349 ns im selben Cluster liegen (Cluster von 0 ns bis ca. 4,871 ns). Dies lässt darauf schließen, dass ausschließlich das Protein nicht aber die Cu^{2+} -Ionen betrachtet werden.



Abbildung 58 Zeitliche Abfolge der Konformere während der 14-ns-MD-Simulation. Ähnliche Konformere wurden zu einem „Cluster“ zusammengefügt. Die Farbskala weist auf die unterschiedlichen Cluster hin, die nur die Struktur des Proteins widerspiegeln.

Die hohe Anzahl an unterschiedlicher Konformeren ist für IDPs zwar nicht ungewöhnlich, dennoch spiegelt es nicht den ganzen Charakter des Proteins wieder. MD-Simulationen können, trotz fluktuierender Temperatur, einige Energiebarrieren im Konformationsraum nicht überwinden und somit nicht alle Energieminima durchlaufen, die relevant sein können. Um das Modell, das bis jetzt nur eine mögliche Konformation aus dem Konformationsraum darstellt (**Abbildung 51**), weiter zu verbessern ist daher die Methode des „Umbrella-sampling“ eine akzeptable Erweiterung [118]. In diesem Fall bietet sich das bisherige Modell als Ausgangsstruktur an, um weitere stabile AtHIRD11- Cu^{2+} -Komplex-Konformere zu finden. Nichtsdestotrotz spiegelt das bisherige Modell die Notwendigkeit von *L*-Histidylresten für die Komplexierung von Cu^{2+} -Ionen wider. Eine Validierung des Modells könnte durch weiterführende Untersuchungen, wie eine Strukturaufklärung mittels SAXS und NMR erfolgen [133]. Dabei könnte sowohl das freie Protein als auch der AtHIRD11- Cu^{2+} -Komplex analysiert werden. Die bindenden Aminosäureseitenkettenreste geben sich NMR-spektroskopisch durch eine Peakverbreiterung zu erkennen [162].

8. Die Domänen D1 und D6 des Proteins AtHIRD11

Die Eigenschaften von AtHIRD11 können für einige Funktionen, wie in **Kapitel 7** beschrieben, eindeutig spezifischen Segmenten zugeordnet werden. Hier spielen vor allem die Nukleotidbindungseigenschaften des Y-Segmentes, das S-Segment welches durch seine zahlreichen L-Serylresten ein Ziel für Phosphorylierungen darstellt und das konservierte K-Segment, das eine amphiphile Helix bildet, eine entscheidende Rolle [149, 158]. Aber Eigenschaften, wie die Möglichkeit Metallionen zu binden, können diesen Segmenten nicht eindeutig zugeordnet werden und somit auch nicht die damit verbundene Radikalfängereigenschaften. Eine genauere Zuordnung dieser Eigenschaft zu bestimmten Sequenzfragmenten erfolgte teilweise durch die Untersuchung von ROS-Reduktion (siehe **Kapitel 7.1.**) in Anwesenheit von Cu²⁺-Ionen [157].

Hierfür wurde das Protein in 7 Domänen aufgeteilt (D1 - D7). Diese wurden synthetisiert und analysiert. Es wurde auch die Anzahl der L-Histidylreste in den einzelnen Domänen und im ganzen Protein mit der ROS-Reduktion korreliert [152, 157].

Es ist dabei ersichtlich, dass die D6-Domäne die ROS-Bildung am stärksten vermindert, und dass die Domänen D1, D5 und D7, aufgrund ihrer hohen ID₅₀, eindeutig eine andere Funktion erfüllen (**Tabelle 8**).

Tabelle 8 Übersicht über Sequenz, Anzahl an Aminosäureresten (AAN), Anzahl an L-Histidylresten sowie ihren Anteil an der Gesamtlänge des Peptids, ID₅₀-Konzentration für ROS-Reduktion und der auf die Peptidlänge bezogene ID₅₀-Wert. Tabelle geändert nach Hara *et al.* [157].

Peptidname	Sequenz	AAN	Anzahl an L-Histidylresten	L-Histidylanteil [%]	ID ₅₀ [µM]	ID ₅₀ *ANN [µM]
AtHIRD11	D1+D2+D3+ D4+ D5+D6+D7	98	13	13,3	0,58 ± 0,18	56,85 ± 17,66
D1	WMAGLINKI GDAL HIGGGNKE G	22	1	4,5	9,59 ± 0,67	211,00 ± 14,70
D2	WEHKKEEE HKK HVDEHKSG E	20	4	20,0	1,50 ± 0,02	30,03 ± 0,50
D3	WHKEGIV DKIKDKIHG	16	2	12,5	3,32 ± 0,11	53,08 ± 1,78
D4	WGEGKSH DGEGKSHD G	16	2	12,5	3,78 ± 0,14	60,52 ± 2,24
D5	WEKKKKK DKKEKK	13	0	0,0	195,00 ± 3,00	2535,00 ± 39,00
D6	WHHDDGH H	8	4	50,0	1,88 ± 0,05	15,07 ± 0,42
D7	WSSSSSDSD SD	10	0	0,0	75,10 ± 4,20	751,00 ± 42,00

8.1. Gründe für Untersuchung der beiden Domänen

Die Wahl für genauere Untersuchungen mittels ACE- und Modellierungsansätzen fiel auf die D1- (WMAGLINKIGDALHIGGGNKEG) und D6-Domäne (WHHDDGHH). Die D1-Domäne (D1) wurde ausgewählt aufgrund der unter **Kapitel 7.3** bereits erwähnten, geringen Homologien zu dem Transkriptionsfaktor MotA. Ein weiteres Ziel war es, neben der Bestätigung von bereits veröffentlichten Cu^{2+} -Bindungseigenschaften (**Tabelle 8**), mögliche andere metallhaltige Ionen zu finden, die mit D1 und D6 interagieren können [148]. Eine besondere Stellung besitzt hierbei Zn^{2+} , da sowohl die starke Bindung zu AtH1RD11 als auch die Funktion als Kofaktor bei der DNS-Bindung eines Zitrusdehydrins berichtet wurde [148, 151]. Die D6-Domäne (D6) wurde aufgrund ihrer hohen Affinität zu Cu^{2+} -Ionen ausgewählt.

Die mögliche Bindung von Zn^{2+} an D1 und D6 wurde zunächst mittels ACE versucht nachzuweisen und danach die Metallionenkomplexe mit den höchsten Erfolgchancen modelliert. Die experimentellen Ergebnisse zur Bindung von Cu^{2+} -Ionen wurden aus der Literatur entnommen und durch Mobilitäts-Shift-Affinitätskapillarelektrophorese verifiziert [148].

8.2. Experimentelle Ergebnisse der Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophorese

Die Überprüfung der Wechselwirkungen des Peptides D6 mit Ca^{2+} -, Mg^{2+} -, Ba^{2+} -, Sr^{2+} -, SeO_3^{2-} -, Mn^{2+} -, Zn^{2+} - und Cu^{2+} -Ionen in den Konzentrationen 250 $\mu\text{mol/L}$ und 500 $\mu\text{mol/L}$ bzw. für Zn^{2+} zusätzlich in der Konzentration 125 $\mu\text{mol/L}$ ergab unterschiedliche Ergebnisse. Während die Erdalkalimetallionen keine signifikante Interaktion zeigten (**Abbildung 59**), war eine Änderung des $\Delta R/R_f$ -Wertes für SeO_3^{2-} -, Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen zu erkennen. Im Falle von Zn^{2+} trat diese Änderung nur in der Konzentration 500 $\mu\text{mol/L}$ auf (**Abbildung 60**).

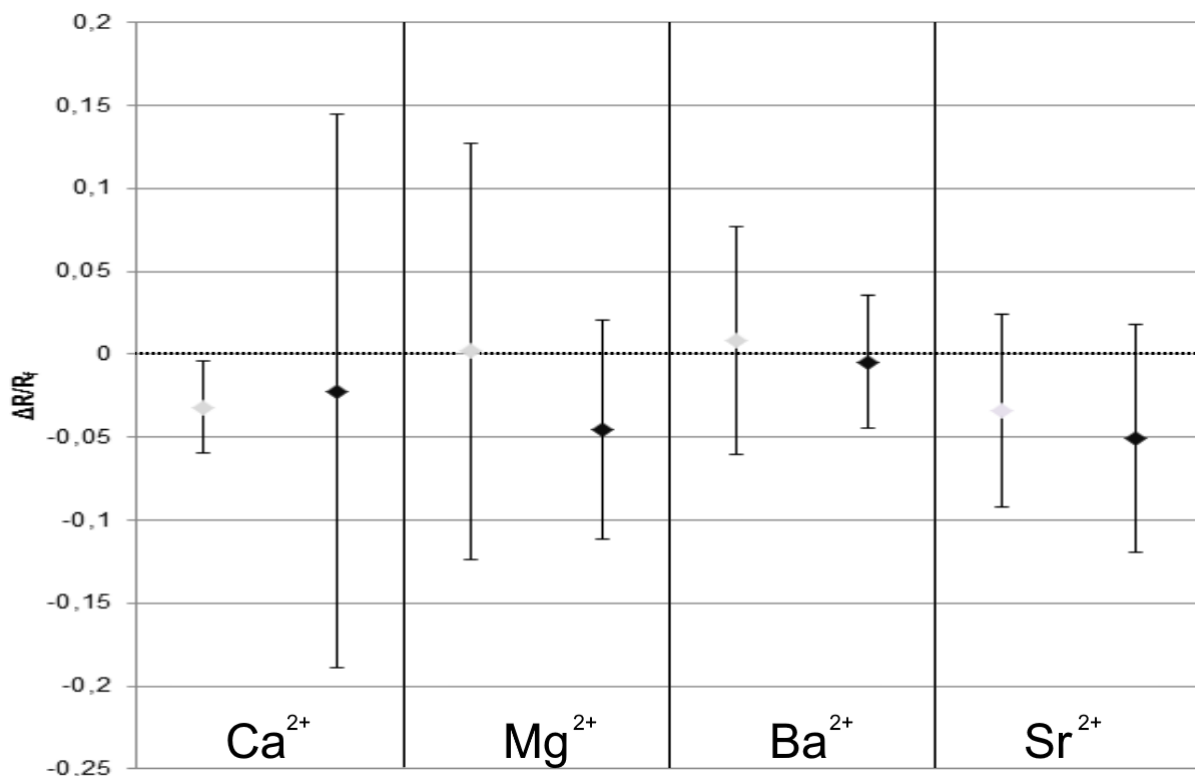


Abbildung 59 Übersicht über $\Delta R/R_f$ -Werte für die Interaktionen zwischen der D6-Domäne und den Erdalkalimetallionen Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} und Sr^{2+} in den Konzentrationen 250 $\mu\text{mol/L}$ (grau) und 500 $\mu\text{mol/L}$ (schwarz) mit ihrem Konfidenzintervall für einen α -Fehler von 5% (Balken).

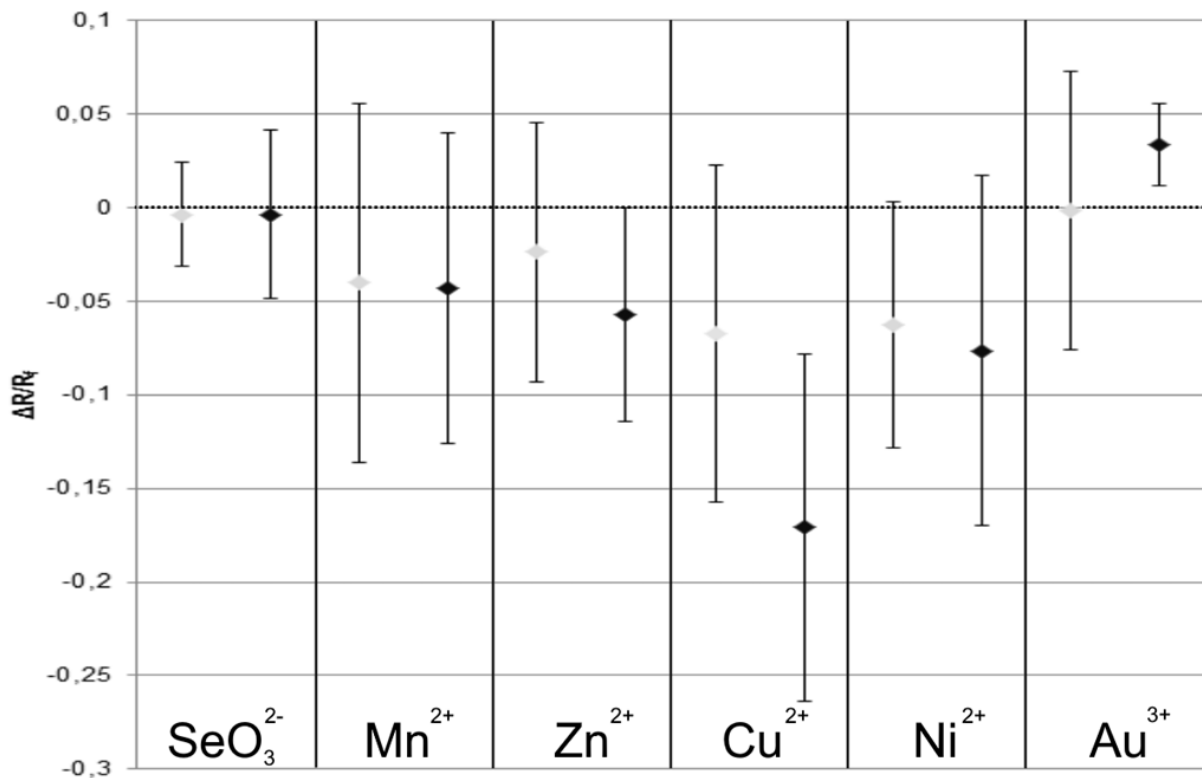


Abbildung 60 Übersicht über $\Delta R/R_f$ -Werte für die Interaktionen zwischen der Domäne D6 und den metallhaltigen Ionen SeO_3^{2-} , Mn^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} in den Konzentrationen 250 μmol/L (grau) und 500 μmol/L (schwarz) mit ihrem Konfidenzintervall für einen α -Fehler von 5% (Balken). Zusätzlich wurde Zn^{2+} und Cu^{2+} in der Konzentration 125 μmol/L (weiß) untersucht. Cu^{2+} zeigte einen zweiten Peak (Rechteck) für die Konzentration 250 μmol/L.

Aufgrund dieser Ergebnisse und den unerwartet großen Konfidenzintervallen für Zn^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen sowie das Auftreten mehrerer Peaks bei Cu^{2+} , wurden die Experimente für die Konzentrationen 250 bzw. 500 μmol/L mit Ausnahme von SeO_3^{2-} wiederholt.

Der zweite Peak der 250 μmol/L Cu^{2+} -Messung zeigte sich in den darauf folgenden Wiederholungsmessungen lediglich als nicht integrierbare Schulter (vgl. **Abbildung 61** und **Abbildung 62**).

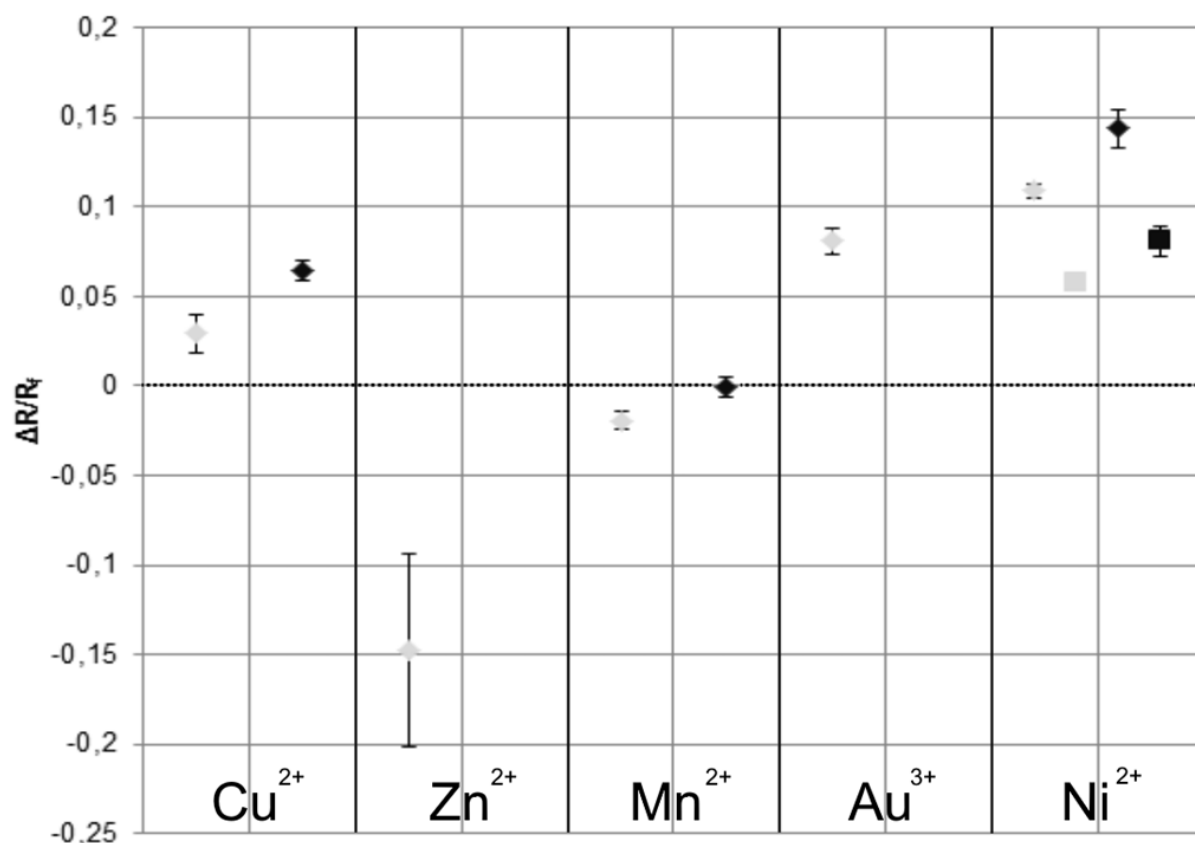


Abbildung 61 Übersicht über $\Delta R/R_0$ -Werte für die untersuchten Interaktionen der D6-Domäne der Wiederholungsmessungen. Es wurden die Kationen Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Au^{3+} und Ni^{2+} und in den Konzentrationen 250 $\mu\text{mol/L}$ (grau) und 500 $\mu\text{mol/L}$ (schwarz) untersucht. Die Ergebnisse wurden beinhalten ein Konfidenzintervall mit einem α -Fehler von 5% (Balken). Ni^{2+} zeigte einen zweiten Peak (Rechteck) für die Konzentrationen 250 und 500 $\mu\text{mol/L}$.

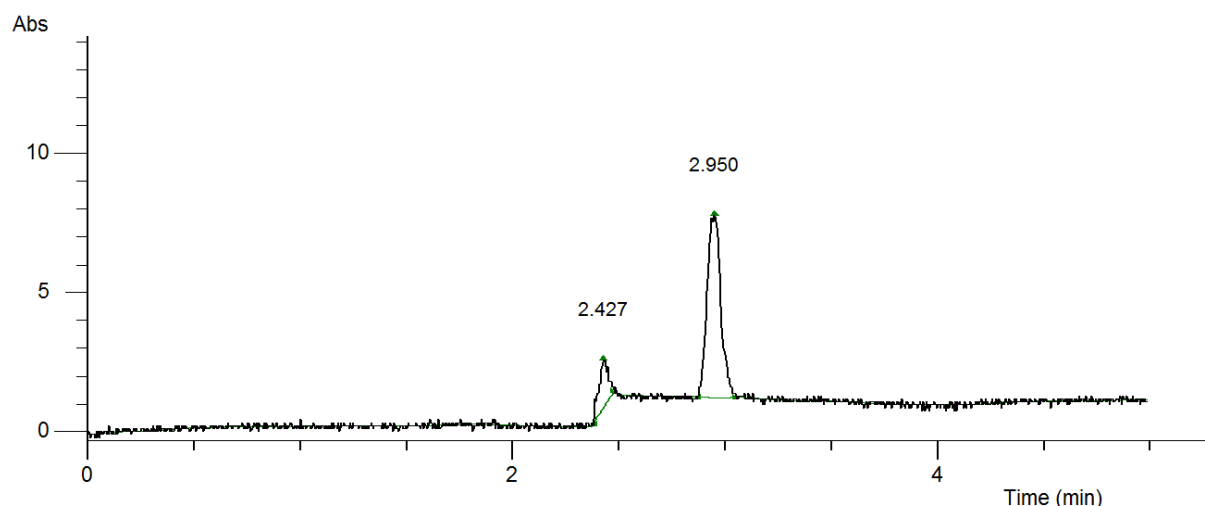


Abbildung 62 Beispiелеktropherogramm für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen D6 und 250 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} mit EOF-Markerpeak (2.427) und einem D6-Peak (2.950). Der erwartete zweite D6-Peak blieb in dieser Versuchsreihe aus.

Auch zeigten die Konfidenzintervalle des ersten Peaks und des Peaks der Wiederholungsmessung nur eine geringe Überschneidung. Dies ist auf eine stärkere Schwankung der Migrationszeiten des EOF-Markers und der D6-Domäne in der ersten Versuchsreihe zurückzuführen. Der Grund liegt im Versuchsaufbau. Da vor der ersten Messreihe das Peptid noch nicht näher charakterisiert war, wurde es

zunächst ohne Acetanilid in der Probe untersucht um eine Verschleierung von Peptidpeaks im Bereich des EOF-Markers zu umgehen. Somit werden auch die R_f -Werte beeinflusst, und der Schwerpunkt des Konfidenzintervalls verschiebt sich zwangsläufig. Es liegen, aufgrund des Versuchsaufbaus, drei Messungen zwischen der erneuten Bestimmung derselben Migrationszeit. Auf diese Weise kann durch die häufigeren Spülprozeduren zwar mehr Peptid von der Kapillarinnenwand entfernt werden, allerdings können sich auch mehr Kationen an dieser Wand anlagern. Dies ist auf eine unvollständige Entfernung der Metallionen durch die Spülschritte zu erklären und die damit verbundene stetige Zunahme an Metallionen an der Kapillarinnenwand.

Bei der erneuten Bestimmung der Interaktionen wurde der EOF-Marker der Peptidprobe zugesetzt. So konnten die Migrationszeiten mit einer höheren Präzision bestimmt werden, da nur noch eine Messung zwischen der erneuten Bestimmung derselben elektrophoretischen Mobilität liegt. Die Abhängigkeit der Migrationszeiten von Acetanilid und D6 durch das gemeinsame Vermessen im selben Lauf, führt auch zu einer geringeren Varianz der R_f - bzw. R_f -Werte und somit zu kleineren Konfidenzintervallen. Für die hohe Konzentration von Cu^{2+} (500 $\mu\text{mol/L}$) ist zu erkennen, dass das Konfidenzintervall der ersten Messreihe vollständig in dem Intervall der Wiederholungsmessung liegt, und daher beide Messreihen vergleichbare Ergebnisse mit unterschiedlicher Genauigkeit abbilden.

Eine Ähnlichkeit der Ergebnisse sind für die Messungen mit Zn^{2+} -Ionen nicht zu erkennen (vgl. **Abbildung 60** und **Abbildung 61**). Die extrem großen Konfidenzintervalle der ersten Messreihe lassen sich auf die schlechtere Entfernung der Zn^{2+} -Ionen von der Kapillarinnenwand und die damit verbundene Änderung des EOFs zurückführen. Dies lässt sich durch die Betrachtung der Acetanilid-Migrationszeiten und ihre Abnahme in Gegenwart von Zn^{2+} erklären. Die Messwerte der Wiederholung sind durch die geringere Anzahl an Messungen mit Zn^{2+} -Ionen im Hintergrundelektrolyt verlässlicher, da durch die gleichzeitige Bestimmung der Migrationszeiten von Acetanilid und D6 der R_f -Wert mit einem kleineren Fehler bestimmt werden kann. Da hier auch keine Messreihe mit einer weiteren Konzentration von Zn^{2+} voranging, ist der Einfluss auf den EOF-Marker für die Berechnung der Interaktionen zwischen D6 und 250 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} -Ionen geringer.

Die Untersuchung der Interaktion zwischen dem D6 und 500 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} -Ionen zeigte keine Peaks, die dem Peptid zugeordnet werden konnten. Hier hat sich der EOF so stark geändert, dass das Peptid deutlich länger zum Passieren des Detektors benötigt hat und daher kein dazugehöriger Peak während der Meßzeit auftrat.

Das Integrieren der Peaks konnte auch für 500 $\mu\text{mol/L}$ Au^{3+} nicht erfolgen, da sie nicht eindeutig identifiziert werden konnten (**Abbildung 63**).

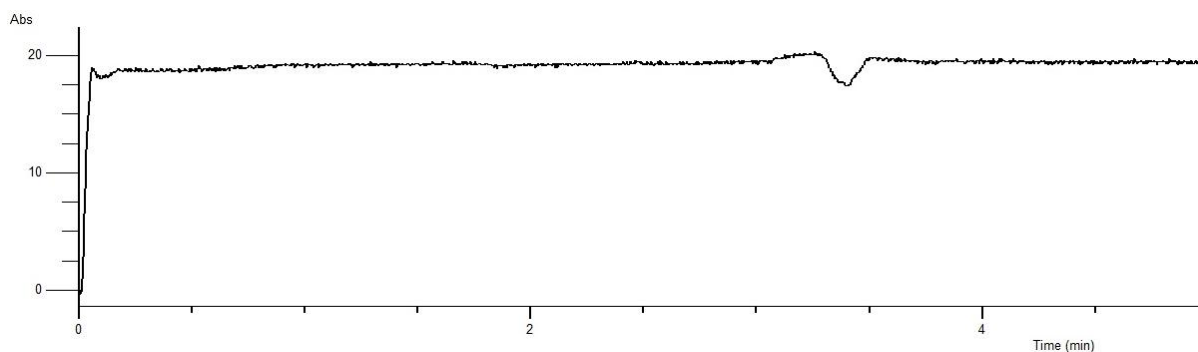


Abbildung 63 Beispielelektropherogramm für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen D6 und 500 $\mu\text{mol/L}$ Au^{3+} ohne eindeutig integrierbare Peaks.

Bei der niedrigeren Konzentration (250 $\mu\text{mol/L}$ Au^{3+} -Ionen) konnte eine leichte Wechselwirkung mit einer Zunahme der negativen Gesamtladung des Komplexes gegenüber des ungebundenen Peptids (**Abbildung 61**) festgestellt werden.

Im Gegensatz zur ersten Messreihe, zeigte die zweite sowohl für 250 $\mu\text{mol/L}$ als auch für 500 $\mu\text{mol/L}$ Mn^{2+} -Ionen eine signifikante Änderung des $\Delta R/R_f$ -Wertes und somit eine Interaktion zwischen der D6-Domäne und Mn^{2+} -Ionen (**Abbildung 61**).

Bei den Interaktionsstudien mit Ni^{2+} -Ionen konnte für D6 eine Aufspaltung des Peptidpeaks in zwei nicht basisliniengetrennte Peaks beobachtet werden (**Abbildung 64**).

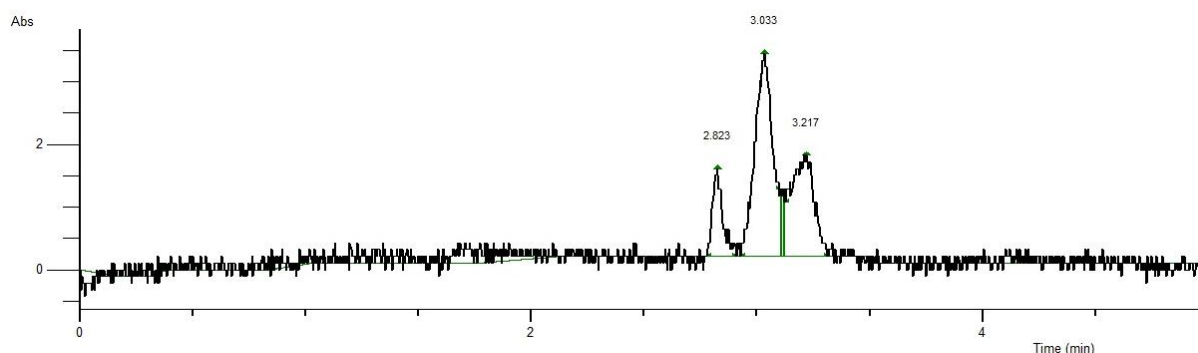


Abbildung 64 Beispiелеktropherogramm für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen D6 und 500 $\mu\text{mol/L}$ Ni^{2+} mit EOF-Markerpeak (2.823) und zwei D6-Peaks (3.033 und 3.217).

Nichtsdestotrotz wurden für beide Peaks und beide Konzentrationen (250 und 500 $\mu\text{mol/L}$) starke Interaktionen mit kleinem Konfidenzintervall gefunden (**Abbildung 61**). Die Ergebnisse lassen auf Komplexe, die positiver geladen sind als das ungebundene D6-Peptid, schließen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die D6-Domäne keine signifikante Änderung des $\Delta R/R_f$ -Wertes für Erdalkalielemente zeigt. Hingegen zeigen alle untersuchten Übergangsguppenkationen und das SeO_3^{2-} -Anion Änderungen im $\Delta R/R_f$ -Wert. Die Unterschiede in den Ergebnissen zwischen Erdalkalimetall- und Übergangsmetallionen lässt auf eine überwiegende Komplexierung durch Stickstoffatome, wie sie in der Peptidbindung und den *L*-Histidylresten enthalten sind, schließen. Bei einer ausschließlichen Komplexierung mit Carboxylat- bzw. Peptidbindungssauerstoffatomen, die Erdalkalimetallionen eine Interaktion zeigen würden und Zn^{2+} , als weiche Lewis-Säure, keinen stabilen Komplex bilden könnte. Die Interaktionsstudien zwischen der D1-Domäne und Mg^{2+} -, Ca^{2+} -, Ba^{2+} -, Sr^{2+} -, Zn^{2+} -, Ni^{2+} -, Au^{3+} -, Cu^{2+} -, Mn^{2+} - und SeO_3^{2-} -Ionen in den Konzentrationen 250 und 500 $\mu\text{mol/L}$ bzw. 25 und 50 $\mu\text{mol/L}$ für Zn^{2+} zeigten nur signifikante Änderungen des $\Delta R/R_f$ -Wertes für Ca^{2+} -Ionen in der Konzentration 250 $\mu\text{mol/L}$, Au^{3+} -Ionen für 500 $\mu\text{mol/L}$ und Cu^{2+} -Ionen in beiden Konzentrationen (vgl. **Abbildung 65** und **Abbildung 66**).

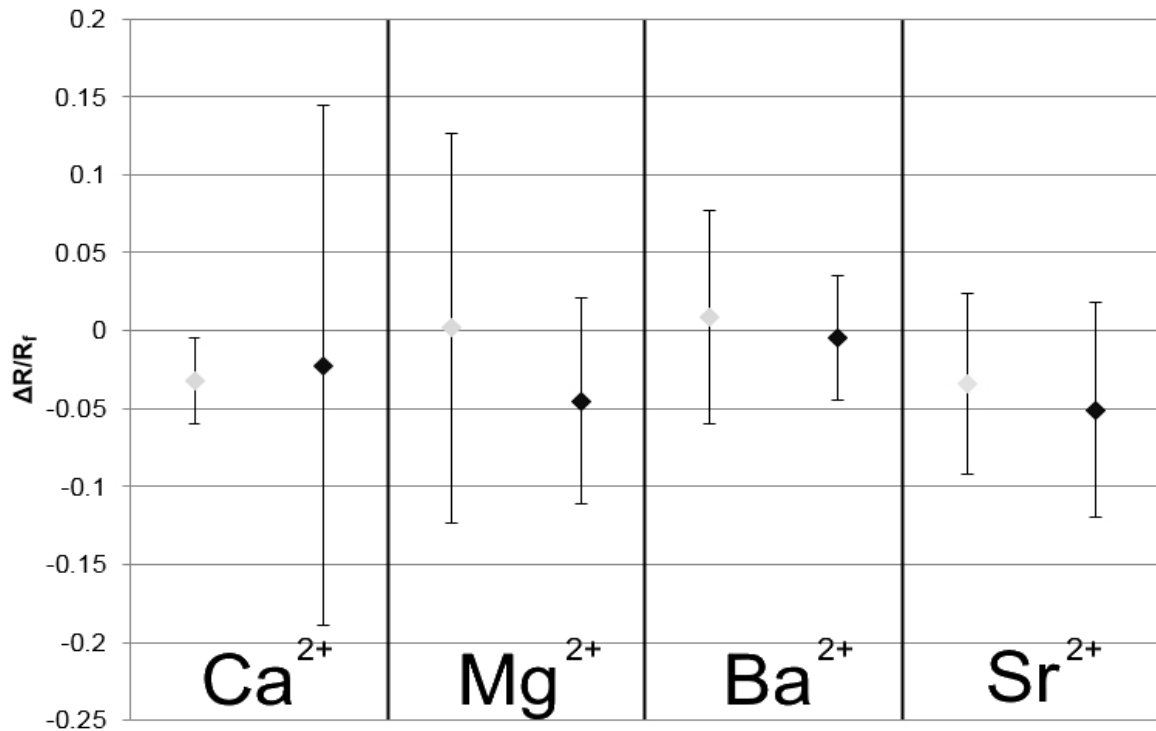


Abbildung 65 Übersicht über $\Delta R/R_f$ -Werte für die Interaktionen zwischen der D1-Domäne und den Erdalkalimetallionen Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} und Sr^{2+} in den Konzentrationen 250 $\mu\text{mol/L}$ (grau) und 500 $\mu\text{mol/L}$ (schwarz) mit ihrem Konfidenzintervall für einen α -Fehler von 5% (Balken).

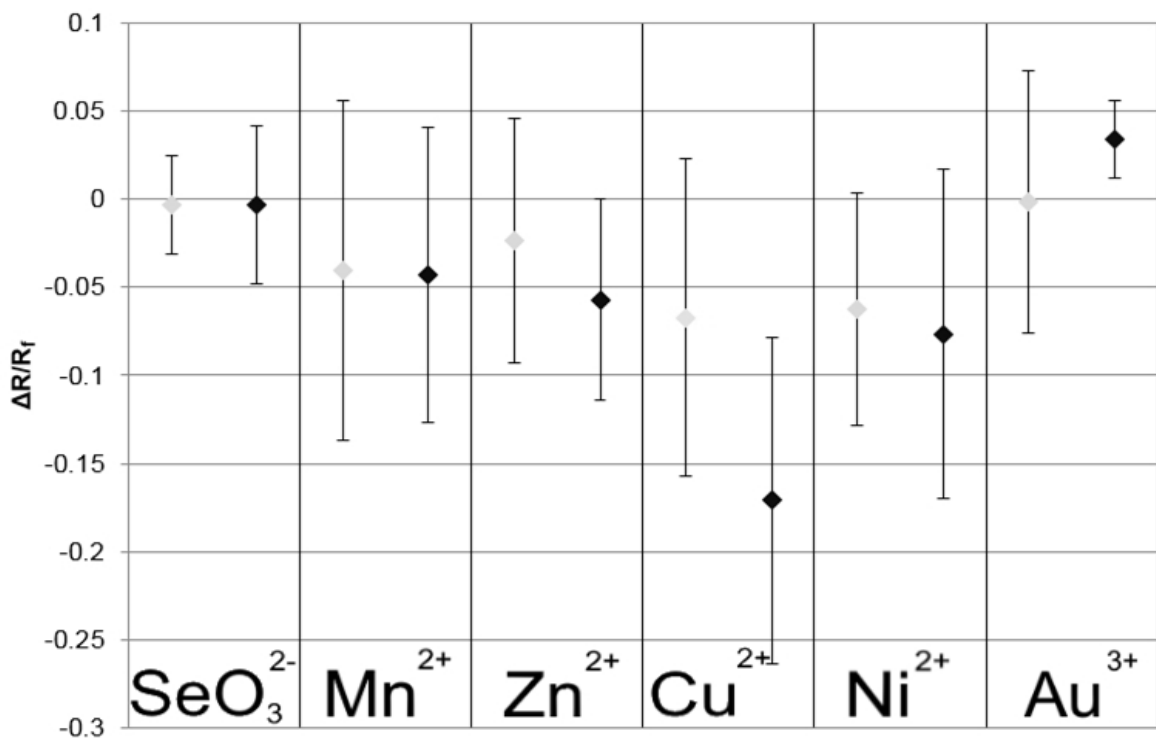


Abbildung 66 Übersicht über $\Delta R/R_f$ -Werte für die Interaktion zwischen der Domäne D1 und den metallhaltigen Ionen SeO_3^{2-} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} und Au^{3+} in den Konzentrationen 250 $\mu\text{mol/L}$ (grau) und 500 $\mu\text{mol/L}$ (schwarz) mit ihrem Konfidenzintervall für einen α -Fehler von 5% (Balken). Für Zn^{2+} wurden die Konzentration auf 25 $\mu\text{mol/L}$ und 50 $\mu\text{mol/L}$ reduziert um Wechselwirkungen mit der Kapillarinne wand zu verhindern.

Die fehlende signifikante Änderung des $\Delta R/R_f$ -Wertes für 500 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} -Ionen lässt sich leicht anhand der erhobenen Daten erklären. Wirft man einen genaueren Blick auf die Migrationszeiten sieht man, dass sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit des Kations im Puffer ein Drift der Migrationszeiten des EOF-Markers zu sehen ist (vgl. **Tabelle 9**). Dieser Drift verläuft nicht gleich stark in beiden Ansätzen. Der Drift ist in Anwesenheit der Ca^{2+} -Ionen stärker ausgeprägt. Aufgrund dieser Änderung streuen die berechneten R-Werte stärker, dies führt zu einem größeren Konfidenzintervall, das auch die Nulllinie schneidet. Somit kann man von keiner Änderung im $\Delta R/R_f$ -Wert ausgehen und daher ist keine Wechselwirkung zwischen Ca^{2+} und D1 in dieser Konzentration zu erkennen.

Tabelle 9 Übersicht über die Migrationszeiten des EOF-Markers Acetanilid während den D1-Untersuchungen zu Interaktionen mit 500 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} . Es ist sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Ca^{2+} ein Drift in den Migrationszeiten zu erkennen.

Lauf	Migrationszeit in Abwesenheit von 500 μM Ca^{2+} [min]	Migrationszeit in Anwesenheit von 500 μM Ca^{2+} [min]
1	1,175	1,417
2	1,167	1,392
3	1,175	1,417
4	1,175	1,400
5	1,083	1,217
6	1,100	1,217

Die Experimente zeigen auch, dass die D1-Domäne keine weichen Lewis-Säuren binden kann und nur Ca^{2+} - und Au^{3+} -Ionen als einzige harte Lewis-Säuren bindet. Die mittelstarke Lewis-Säure Cu^{2+} kann auch von dem Peptid komplexiert werden, da dieses Kation Charakteristika von weichen und harten Lewis-Säuren aufweist. Aufgrund dessen ist eine computerchemische Untersuchung des Bindungsmechanismus von Interesse.

Cu^{2+} kann ähnlich wie eine harte Lewis-Säure komplexiert werden oder kann mit weichen Lewis-Basen koordinieren. Der erst genannte Mechanismus wurde durch den Austausch des Ca^{2+} aus dem entsprechenden D1-Komplex mit anschließender Geometrieoptimierung mittels MM-Methoden untersucht.

8.3. Modellierte Komplexe

Die Grundlage für die Modellierung der Komplexe bildeten, wie für den AtHIRD11- Cu^{2+} -Komplex, die beobachteten bevorzugten Liganden und die Bindungslängen und -winkel aus den Arbeiten von Harding *et al.* [64, 163]. Es wurde neben den klassischen einkernigen Komplexen für D1 und D6 mit Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen auch ein zweikerniger D6- Zn^{2+} -Komplex untersucht.

8.3.1. Molekülmechanische Modelle

Der erste Schritt der Modellierung bestand in der Bestimmung der Überführung der Peptide in die möglichen Komplexe mittels MM (Kraftfeld Amber96). Die Güte der Komplexe wurde mittels RMSD-Wert bestimmt, und für vielversprechende Komplexe ($\text{RMSD} < 0,3 \text{ \AA}$) wurde eine genauere semi-empirische Berechnung der Struktur mittels PM7 durchgeführt. Die erhaltenen Komplexe wurden anschließend absteigend nach ihrer inneren Energie bewertet. Die verwendeten Energiewerte bilden hierbei keine absoluten Werte, sondern orientieren sich an der Ausgangsstruktur.

Die Komplexe wurden jeweils benannt mittels Peptidname, Koordinationszahl, Koordinationsgeometrie (tet = tetraedisch; quad = quadratisch-planar) und Einbuchstabencode der bindenden Aminosäurenreste sowie deren Nummer (Nummerierung ausgehend vom N-Terminus). Im Falle einer Bindung über ein Carboxylatsauerstoffatom wurde zur Unterscheidung der beiden Sauerstoffe diese mit

„a“ und „b“ bezeichnet, da sich diese Komplexe in ihrer räumlichen Anordnung der beiden Sauerstoffe unterscheiden können.

Bei der Überprüfung der D6-Cu²⁺-Komplexe mittels Amber96-Kraftfeld wurde nur ein Komplex mit einem RMSD-Wert unter 0,3 Å (0,234 Å) gefunden. Bei diesem Komplex ist das Cu²⁺-Ion durch die Imidazolstickstoffatome der *L*-Histidylreste 7 und 8 sowie der Carboxylatsauerstoffe „b“ der *L*-Aspartylreste 4 und 5 komplexiert.

Bei der Untersuchung von D6-Zn²⁺-Komplexen wurden auf der Stufe der MM-Modellierung 23 mögliche Komplexe gefunden, die die Bedingung eines RMSD-Wertes unter 0,3 Å erfüllten. Um die Anzahl der Möglichkeiten weiter zu reduzieren, wurden diese anschließend semi-empirisch Neuberechnet.

Die Dimere zeigten schlechtere RMSD-Werte. Während für eines der beiden Zentren ein Wert unter 0,3 Å erreicht wurde, zeigte das zweite Zentrum in der Regel einen höheren Wert (RMSD ≥ 0,3 Å). Daher wurde in diesem Fall auch ein dimerer D6-Zn²⁺-Komplex mit den RMSD-Werten 0,3 Å und 0,2 Å für die beiden Zentren semi-empirisch berechnet (**Abbildung 67**).

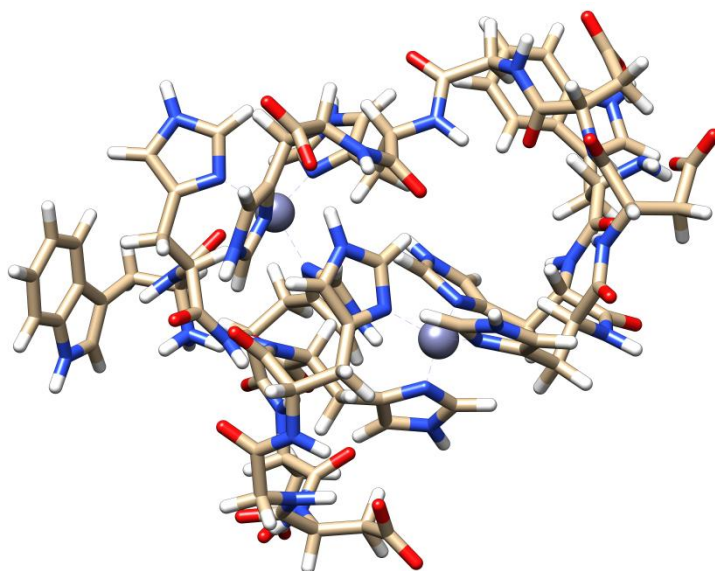


Abbildung 67 Dimerer D6-Zn²⁺-Komplex mit zwei Zn²⁺-Zentren. Die Zentren werden durch ein Zn²⁺-Ion und vier β-Imidazolstickstoffatomen gebildet. Diese werden jeweils von zwei benachbarten *L*-Histidylresten aus jeweils einem der Monomer zur Verfügung gestellt (H2 und H3 bzw. H7 und H8).

Die dimeren D6-Cu²⁺-Komplexe zeigten mindestens für eines der beiden Zentren einen RMSD-Wert über 0,44 Å und wurden daher nicht weiter untersucht.

Die Modellierungen, die auf Grundlage der D1-Domäne durchgeführt wurden, orientierten sich an den ACE-Ergebnissen und dem Homologiemodell, das mittels Phyre2 erstellt wurde (**Abbildung 72**) [123].

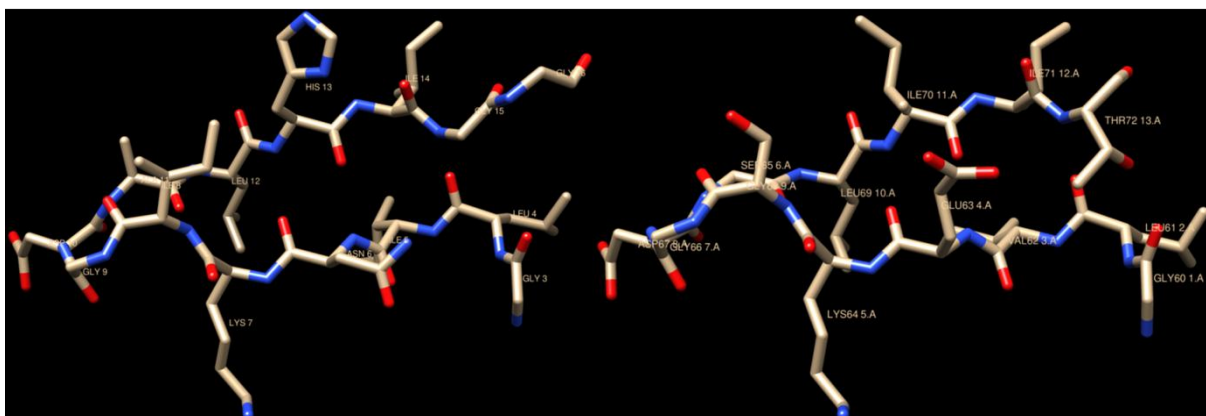


Abbildung 68 Vergleich der Homologensequenz von D1 (links) und dem entsprechenden MotA-Motiv (rechts) mit Dreibuchstabencode und Nummerierung der Aminosäurereste ausgehend vom N-Terminus des Gesamtproteins (links: AtHIRD11; rechts: DNS/RNS-Bindungsschleife aus MotA).

Aus den ACE-Resultaten ging hervor, dass die Erstellung eines Modells für den D1- Ca^{2+} - und den D1- Cu^{2+} -Komplex von größerem Interesse ist als eine Untersuchung zu möglichen D1- Zn^{2+} -Komplexen, da für diese beiden Ionen eine Änderung des $\Delta R/R_f$ -Wertes festgestellt werden konnte (vgl. **Abbildung 65** und **Abbildung 66**). Die Modellierung eines D1- Au^{3+} -Komplexes wurde aufgrund der von Comba *et al.* beschriebene schlechtere Parametrisierung bzw. teilweise fehlende Parametrisierung von Nebengruppenelementen der zweiten und dritten Reihe des Periodensystems in den verwendeten Kraftfeldern nicht durchgeführt [92, 164, 165].

Das Ergebnis der D1- Ca^{2+} -Komplex-Modellierungen ergab nur einen stabilen Komplex mit einem quadratisch-planar koordiniertem Ca^{2+} -Ion. Der Komplex wies einen RMSD-Wert von 0,557 Å auf, der sich auch nach der semi-empirischen Berechnung nicht wesentlich verändert hat (**Abbildung 69**).

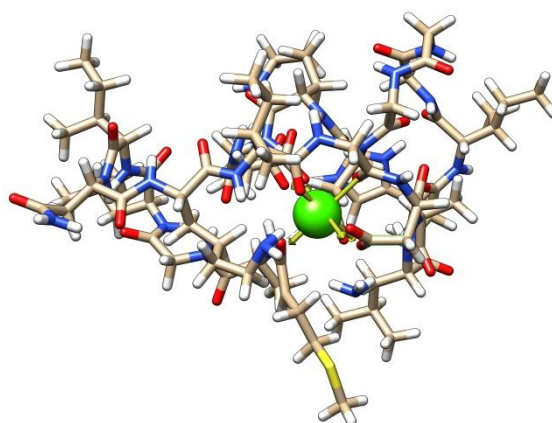


Abbildung 69 Struktur des D1- Ca^{2+} -Komplexes mit einem RMSD-Wert von 0,566 Å. Das Ca^{2+} -Ion ist hierbei oktaedrisch von den Peptidsauerstoffatomen von Met1, Ile8, Gly9 sowie des Carboxylatsauerstoffatoms von Asp10 und dem C-terminalen Carboxylat von Gly21 koordiniert.

Die Modellierung des D1- Cu^{2+} -Komplexes wurde durch den Austausch des Ca^{2+} -Ions durch ein Cu^{2+} -Ion bewerkstelligt. Eine systematische Untersuchung der möglichen Cu^{2+} -Komplexe ist durch den intermediären Lewis-Säurecharakter erschwert und impraktikabel, da bereits unter alleiniger Berücksichtigung der Peptidbindungen als Elektronenpaardonatoren sowie der KZ 4 und 6 (ohne Unterscheidung zwischen tetraedrischer und quadratisch-planarer Koordination), 60.249 Kombinationsmöglichkeiten vorliegen. Dieser Austausch schränkt auch die möglichen Ergebnisse ein,

da auf diese Weise nur untersucht wird, ob die Komplexierung von Ca^{2+} und Cu^{2+} durch dieselben Bindungspartner bedingt ist.

Nach dem Austausch und einer Geometrieoptimierung ergab sich ein quadratisch-planarer Cu^{2+} -Komplex mit einem RMSD-Wert von 0,566 Å, der semi-empirisch weiteroptimiert wurde (**Abbildung 70**).

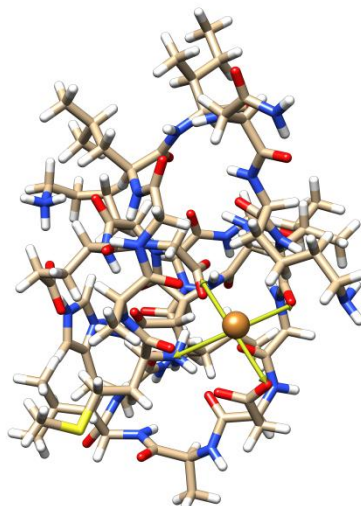


Abbildung 70 Struktur des D1- Cu^{2+} -Komplexes mit einem RMSD-Wert von 0,566 Å. Das Cu^{2+} -Ion ist hierbei quadratisch-planar von den Peptidsauerstoffatomen von Met1, Ile8 sowie einem Carboxylatsauerstoffatom von Asp10 und dem C-terminalen Carboxylat von Gly21 koordiniert.

8.3.2. Semi-empirisch berechnete Modelle

Die präzisere Berechnung der Komplexe mit Hilfe der semi-empirischen Methode PM7 (vgl. **Kapitel 5.2.2.3.**) brachte nicht nur eine Verbesserung der Modelle, sondern auch eine Reduktion der möglichen Komplexe für D6- Zn^{2+} -Komplexe.

Bei der Erstellung eines Modells für den D6- Zn^{2+} -Komplex erfüllten nach molekülmechanischen Berechnungen 23 Komplexe die Voraussetzungen für weitere Untersuchungen (RMSD-Wert $\leq 0,3$ Å). Nach der Neuberechnung mit PM7 konnte die Anzahl der Komplexe auf 10 eingengt werden (**Tabelle 10**).

Tabelle 10 Übersicht über D6-Zn²⁺-Komplexe, die nach semi-empirischer Berechnung noch die Bedingung eines RMSD-Wertes $\leq 0,3$ Å erfüllten. Die Komplexe sind nach zunehmender Verzerrungsenergie sortiert. Bei Änderung der Geometrie nach der Berechnung ist diese in Klammern angegeben. Bezeichnung der Komplexe durch Peptid + KZ + Koordinationszahl + Geometrie (tet oder quad) + Aminosäuren im Einbuchstabencode mit Nummerierung der Reste ausgehend vom N-Terminus.

Bezeichnung des Komplexes	RMSD _{PM7} [Å]	Verzerrungsenergie [Kcal/mol]
D6-KZ4-tet-H2H7H8A4a	0,238	4018,68
D6-KZ4-quad-H2H3H7A5b (tet)	0,144	4077,02
D6-KZ4-tet-H2H7A4aA5b	0,115	4078,23
D6-KZ4-quad-H2H3H8A4b (tet)	0,209	4091,42
D6-KZ4-tet-H2H7A4bA5a	0,110	4096,52
D6-KZ4-tet-H2H3H7H8	0,157	4112,53
D6-KZ4-tet-H3H7H8A4a	0,251	4152,17
D6-KZ4-tet-H2H3A4aA5b	0,256	4152,67
D6-KZ4-tet-H2H7A4bA5a	0,110	4249,08
D6-KZ4-tet-H2H3A4bA5b	0,231	4430,13

Die Verzerrungsenergiewerte in **Tabelle 10** sind keine absoluten Werte und können daher nur als Anhaltspunkt für eine interne Wertung der Komplexe verwendet werden. Die erste Struktur zeigte eine deutlich geringere Verzerrungsenergie als die folgenden Strukturen und besitzt daher die höchste Wahrscheinlichkeit den im ACE-Experiment vorliegenden Komplex richtig abzubilden (**Abbildung 71**).

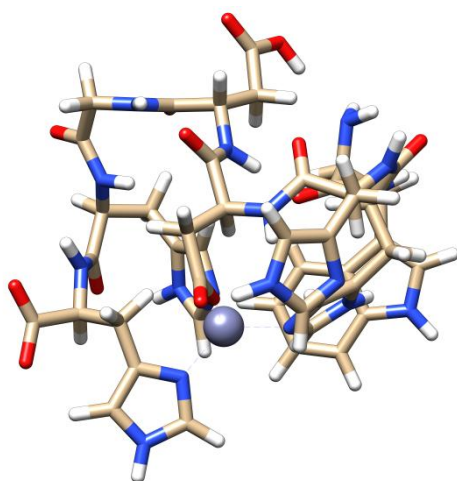


Abbildung 71 Modell des Komplexes D6-KZ4-tet-H2H7H8A4a mit einem RMSD-Wert von 0,238 Å nach Geometrieoptimierung mittels PM7 mit molekülmechanischer Korrektur des Peptidrückgrats.

Bei der semi-empirischen Berechnung des Cu²⁺-Komplexes stieg der RMSD-Wert auf 0,288 Å und blieb somit unterhalb der Grenze (**Abbildung 72**).

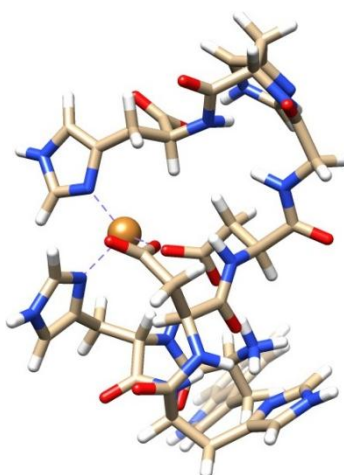


Abbildung 72 Abbildung des Komplexes D6-tet-H7H8A4bA5b. Das Cu^{2+} -Ion ist über zwei vier β -Imidazolstickstoffatomen der *L*-Histidylreste 7 und 8 sowie über Carboxylatsauerstoffatome der Aspartylreste 4 und 5 gebunden.

Der untersuchte D1- Cu^{2+} -Komplex zeigte zwar nach der semi-empirischen Berechnung einen RMSD-Wert von 0,141 Å für eine tetraedrische Koordination, aber auch, dass nun mehr zwei Ligandenbindungsstellen vakant sind (**Abbildung 70**).

Somit unterscheiden sich die Bindungsmodi von Ca^{2+} - und Cu^{2+} -Ionen an der D1-Domäne. Für Cu^{2+} -Ionen postulierte Dunbar *et al.* eine Koordination durch Peptidbindungen mittels Amid-Iminol-Tautomerie [142, 166]. Hierbei bindet das Cu^{2+} -Ion an das Stickstoffatom einer Peptidbindung, es kommt zu einer Umlagerung eines Protons an ein freies Elektronenpaar des Peptidsauerstoffatoms. Anschließend erfolgt die Verschiebung der Elektronendichte, so dass eine Iminolstruktur entsteht (**Abbildung 73**). Dies kann den Unterschied in den Modellen für die D1-Komplexe von Ca^{2+} und Cu^{2+} erklären, da ein einfacher Austausch in diesem Fall ungenügend ist, um einen stabilen Komplex mit einem kleinen RMSD-Wert zu erstellen.

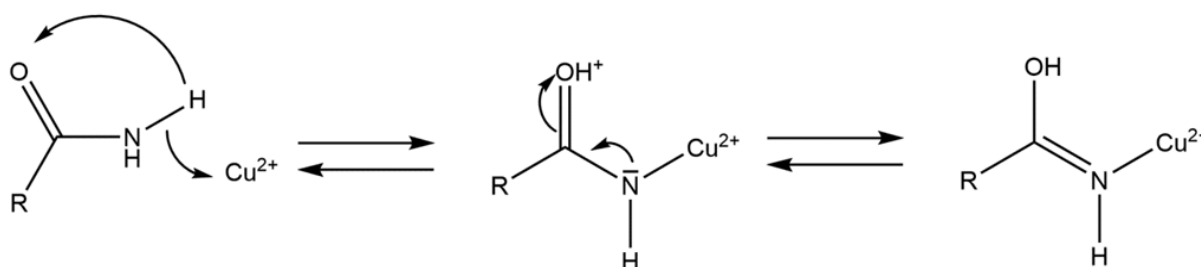


Abbildung 73 Mechanismus der Cu^{2+} -induzierten Amid-Iminol-Tautomerie.

Die Stabilitäten der postulierten D1- und D6-Komplexe im wässrigen Medium sind noch nicht gänzlich geklärt und müssen noch mit weiteren Methoden, wie z. B. einer MD-Simulationen, bestätigt werden.

9. Einblicke in den möglichen Mechanismus der Stabilisierung von Antikörpern durch Hilfsstoffe anhand von Trastuzumab mittels computerchemischen Methoden

Die bereits in Kapitel 2.2.1 und 2.2.2 erläuterten stabilitätsbeeinflussenden Faktoren und Vielfalt an Stabilisatoren für Antikörperzubereitungen machen eine bedachte Auswahl der stabilisierenden Stoffe und ihrer Konzentrationen unabdingbar. Allerdings wird die Zusammensetzung dieser Stoffe noch immer in zeit- und kostenintensiven „Trial-and-Error“-Ansätzen evaluiert. Die Intension dieses Teilprojektes war es die Mechanismen der Stabilisierung auf molekularer Ebene zu verstehen um somit einer rationalen Entwicklung von flüssigen Antikörperzubereitungen den Weg zu ebnen. Zu diesem Zweck wurde die hypervariable Region des Antikörpers Trastuzumab genauer betrachtet, da hier der größte Unterschied zu anderen IgG1-Antikörpern besteht.

9.1. Trastuzumab und seine Bedeutung als Modellantikörper

Der verwendete Antikörper Trastuzumab (Handelsname: Herceptin®) wird in der Therapie zur Behandlung metastasierendem, HER2-positivem Brustkrebs als rekonstituiertes Lyophilisat eingesetzt. Bei diesem Antikörper handelt es sich um einen humanisierten IgG1-Antikörper, der aus Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) gewonnen wird [167]. Der Antikörper eignet sich besonders als Modell, da aufgrund seiner therapeutischen Verwendung sowohl eine Referenzzubereitung vorliegt als auch eine ausreichende Charakterisierung, die nicht nur den Stabilitätsuntersuchungen der „International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use“-Guidelines (ICH-Guidelines) ICH Q1A (R2) entspricht, sondern auch Kristallstrukturen in Proteindatenbanken umfasst. Auch spricht die kurze Haltbarkeit der rekonstituierten Lösung von 48 Stunden bei 2 – 8 °C, für Trastuzumab, für eine Optimierungsmöglichkeit [167].

Die Stabilisierung der Zubereitung erfolgt, bei dem zugelassenem Lyophilisat, durch *L*-Histidin, α,α -Trehalose-dihydrat und Polysorbat 20. Diese Hilfsstoffe spielen sowohl in der Stabilität des Lyophilisats als auch in der Stabilisierung der Lösung eine Rolle (vgl. Kapitel 2.2.1). Kamerzell *et al.* beschreiben, dass Aminosäuren wie *L*-Histidin nicht nur spezifisch mit Proteinen interagieren, sondern auch als Puffersubstanz und Antioxidants wirken [36, 167]. Während α,α -Trehalose zur Einstellung der Tonizität der Infusionslösung und zur Stabilisierung des Antikörpers sowohl in der lyophilisierten Form als auch in der rekonstituierten Lösung verwendet wird. Dies geschieht wie bereits beschrieben durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen, wie präferenzielle Hydratation und aromatische Interaktionen. Das verwendete Polysorbat 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat) dient hauptsächlich als kompetitiver Inhibitor der Antikörperadsorption an Oberflächen [36].

9.2. Auswahl der Hilfsstoffe

Die Modellierung von Kohlenhydrat-Protein- bzw. Kohlenhydrat-Antikörper-Interaktionen erweist sich hingegen als aufwendiger, da Untersuchungen zum Mechanismus der Stabilisierung auch indirekte Wechselwirkungen durch präferenzielle Hydratation beschreiben und somit auch Effekte durch Viskositätserrhöhung [36]. Die verwendete Methode kann den Einfluss der präferenziellen Hydratation zwar auf aggregationsanfälligen Zentren abbilden aber die Änderung der Viskosität nicht ausreichend erfasst.

Aus diesem Grund fiel die Wahl der zu untersuchenden Hilfsstoffe auf die beiden Aminosäuren *L*-Histidin und *L*-Prolin, da eine einfachere Modellierbarkeit zu erwarten ist. Die beiden proteinogene Aminosäuren können von Kraftfelder und Methoden, die zur Untersuchung von Protein-Protein- bzw. Protein-Wirkstoff-Interaktionen geeignet sind, gut beschrieben werden [169].

9.3. Berechnung der Hydrophobizitätszentren

Die Bestimmung der aggregationsanfälligen Zentren des Fv-Fragments von Trastuzumab bzw. den Trastuzumab-Aminosäure-Komplexen geschah mit dem Softwarepaket BioLuminate®. Die Wahl fiel auf diesen Antikörperteil, da hier die hypervariable Region und somit die größten Unterschiede zwischen stabilen und instabilen Antikörpern desselben Typs liegt. Die Software verwendet als theoretische Grundlage die Annahme, dass die Aggregation von auf der Proteinoberfläche liegenden, hydrophoben Aminosäuren ausgeht, die sich in räumlicher Nähe zueinander befinden und somit einen aggregationsanfälligen Raum bilden. Hierzu wird die Oberfläche des Proteins berechnet und ein „protein aggregation propensity“-Score (PAP-Score) ermittelt. Dieser besteht aus der Summe der Oberfläche aller Aminosäurereste in allen aggregationsanfälligen Räumen eines Proteins und ist daher umso höher je mehr hydrophobe Aminosäurereste bzw. je größer diese sind. Die Anwendung des PAP-Scores auf den Antikörper Trastuzumab zeigt, dass im Bereich der CDR3-Schleife der größte aggregationsanfällige Raum liegt (**Abbildung 74**).

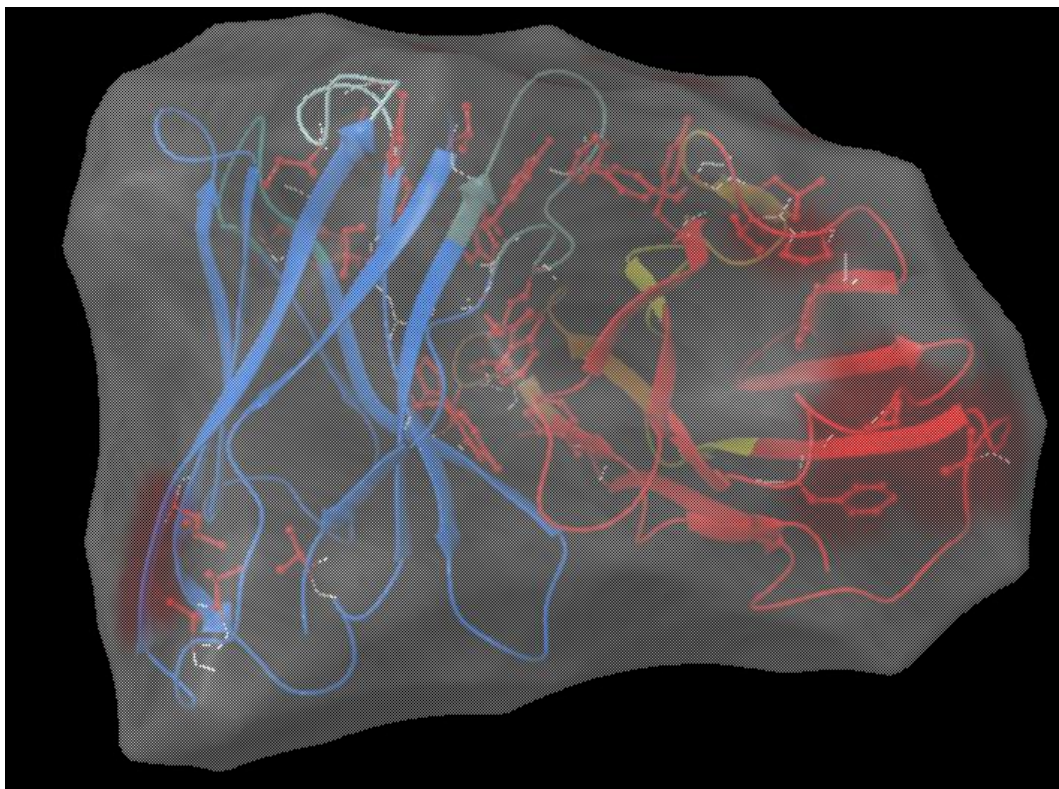


Abbildung 74 Fv-Fragment von Trastuzumab mit PAP-Score-Oberfläche. Die weiße Fläche zeigt eine geringe und die rote Fläche eine hohe Aggregationsneigung an. Der rote Bereich am rechten Rand zeigt die CDR-L3-Schleife und ihren Beitrag zur Aggregation.

Aufgrund der Lage des Bereiches innerhalb der hypervariablen Schleife CDR-L3 und seinem hohen PAP-Score, wurde dieser als eine der wichtigsten stabilitätsbestimmenden Oberflächen identifiziert und als Bindungstasche für die Hilfsstoffe *L*-Prolin und *L*-Histidin deklariert (siehe Gruppe 6 **Tabelle 11**).

Tabelle 11 Übersicht über PAP-Score der einzelnen L-Aminosäurereste, ihren PAP-Score, ihre räumliche Gruppierung und den PAP-Score der Gruppe. Angabe der Aminosäurereste: Kette (Schwere Kette = H; leichte Kette = L) : Nummer und Dreibuchstabencode der Aminosäure.

L-Aminosäurereste	PAP-Score	Gruppe	PAP-Score der Gruppe
H:52 TYR	109	1	169
H:33 TYR	60		
L:54 LEU	139	2	139
H:56 TYR	292	3	292
H:2 VAL	104	4	195
H:102 TYR	47		
H:27 PHE	44		
H:12 VAL	112	5	205
H:18 LEU	93		
L:80 PRO	225	6	517
L:15 VAL	224		
L:83 PHE	68		
L:49 TYR	60	7	118
H:100 PHE	58		
L:59 PRO	74	8	74

9.4. Docking der Hilfsstoffe an den Antikörper

Für das Docking der Hilfsstoffe an Trastuzumab wurden sowohl mehrere Fv-Fragment-Modelle für Trastuzumab als auch zwei Konformere für L-Prolin (P1 und P2) und sechs Konformere für L-Histidin (H1 bis H8) erstellt. Für die Untersuchungen der beiden Aminosäuren wurden jeweils acht unabhängig erstellte Modelle des Fv-Fragmentes verwendet. Anschließend wurde die Änderung des PAP-Scores betrachtet.

9.4.1. Docking von L-Prolin an das Fv-Fragment von Trastuzumab

Bei diesem Versuchsansatz, die Verringerung der Aggregationsneigung zu beschreiben, wurden zunächst starre Konformere von L-Prolin (**Abbildung 75**) in die hydrophobe Bindungstasche, die von Gruppe 6 (L:80 Pro, L:15 Val, L 83 Phe) gebildet wird, eingepasst.

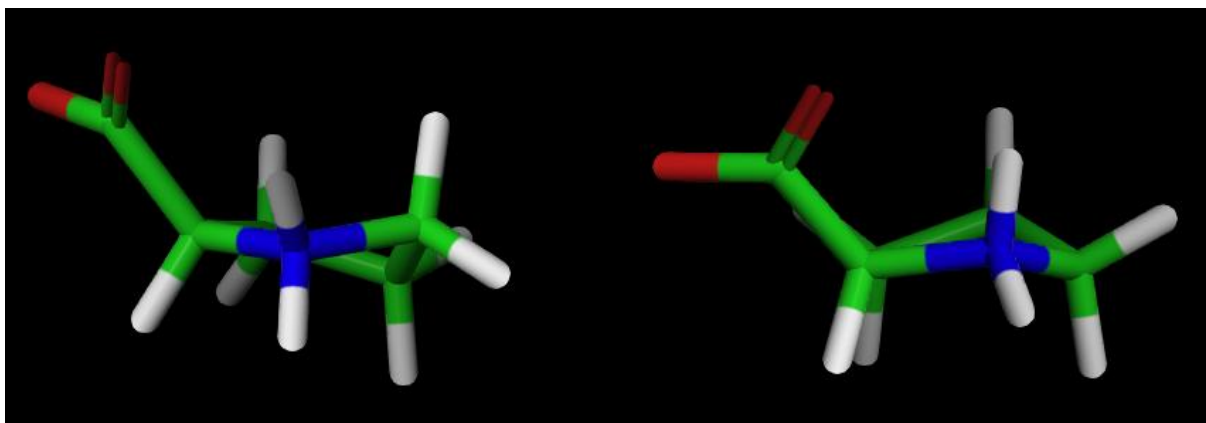


Abbildung 75 Darstellung der beiden *L*-Prolinkonformere. Die linke Konformation besitzt eine sesselähnliche (P1) und die rechte eine wannenähnliche (P2) Struktur.

Anschließend wurde die Änderung des PAP-Scores für das gesamte Fv-Fragment bestimmt und die Wechselwirkungen genauer betrachtet. Die Ergebnisse des Dockings zeigen eindeutig, dass für das Trastuzumabmodell 2 eine deutlich stärkere Erniedrigung des PAP-Scores als für die anderen Modelle vorliegt (vgl. **Abbildung 76**).

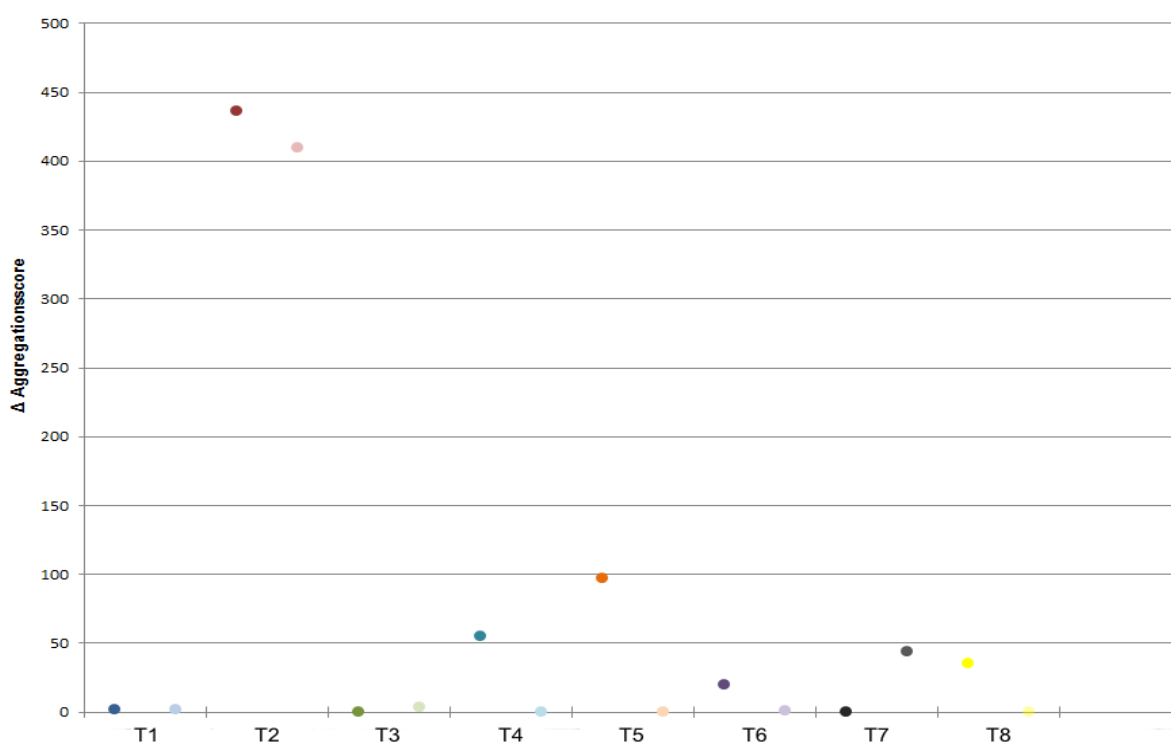


Abbildung 76 Übersicht über die Abnahme des Aggregationsscores (PAP-Score) für die Trastuzumabmodelle T1 bis T8 durch Interaktion mit den *L*-Prolin-Konformeren P1 (dunkler Punkt) und P2 (heller Punkt). Das Modell T2 zeigt die deutlichste Abnahme der Aggregationsneigung für beide Konformere.

Auch die Betrachtung des 3D-Modells zeigt eindeutig, dass bei der modellierten Interaktion neben Van-der-Waals-Wechselwirkungen auch Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen vorliegen (**Abbildung 77**).

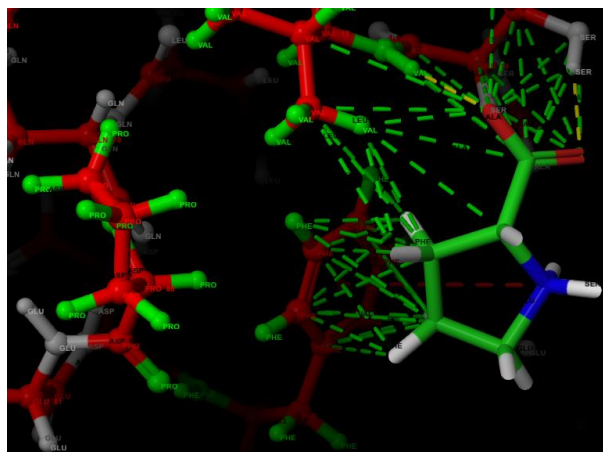


Abbildung 77 Interaktion von *L*-Prolin P1 (rechter Rand) mit *L*-Phenylalanyl-, *L*-Valyl- und *L*-Serylrest der CDR-L3-Schleife von Trastuzumab T2 mit Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlichen Atomen (gestrichelte Linien; grün = Van-der-Waals-Wechselwirkung, gelb = Wasserstoffbrückenbindung, rot = π -Elektronen-Kationen-Wechselwirkung).

In **Abbildung 77** ist zu erkennen, dass der hydrophobe Anteil des *L*-Prolin-Pyrrolidylringes mit den hydrophoben Anteilen der Aminosäurereste in der Bindungstasche interagiert, während die polare Carboxylat-Funktion und das sekundäre Amin des Ringes auf der neuentstandenen Oberfläche zu finden sind. Somit wird die Oberfläche des Trastuzumab-*L*-Prolin-Komplexes hydrophiler. Durch die zusätzlichen Elektronenpaardonatoren (sekundäre Amin- und Carboxylatfunktion) können weitere Wasserstoffbrückenbindungen mit den umgebenden Wassermolekülen auftreten und somit eine irreversible Aggregation an diesem Oberflächenabschnitt unwahrscheinlicher werden lassen. Eine genauere Untersuchung der Stabilität des T2-P1-Komplexes erfolgte in einer anschließenden MD-Simulation.

9.4.2. Docking von *L*-Histidin an das Fv-Fragment von Trastuzumab

Die Auswertung der Trastuzumab-*L*-Histidin-Komplexe ergab im Vergleich zu den korrespondierenden Trastuzumab-*L*-Prolin-Komplexen sehr unterschiedliche Ergebnisse. Nicht nur die Anzahl der stabilen Konformere ist für *L*-Histidin mit sechs deutlich höher, auch finden sich deutlich häufiger Änderungen des PAP-Scores von mehr als 100 Scorepunkten und eine ungünstige Interaktion, die die Aggregationsneigung erhöht, wieder (vgl. **Abbildung 78**).

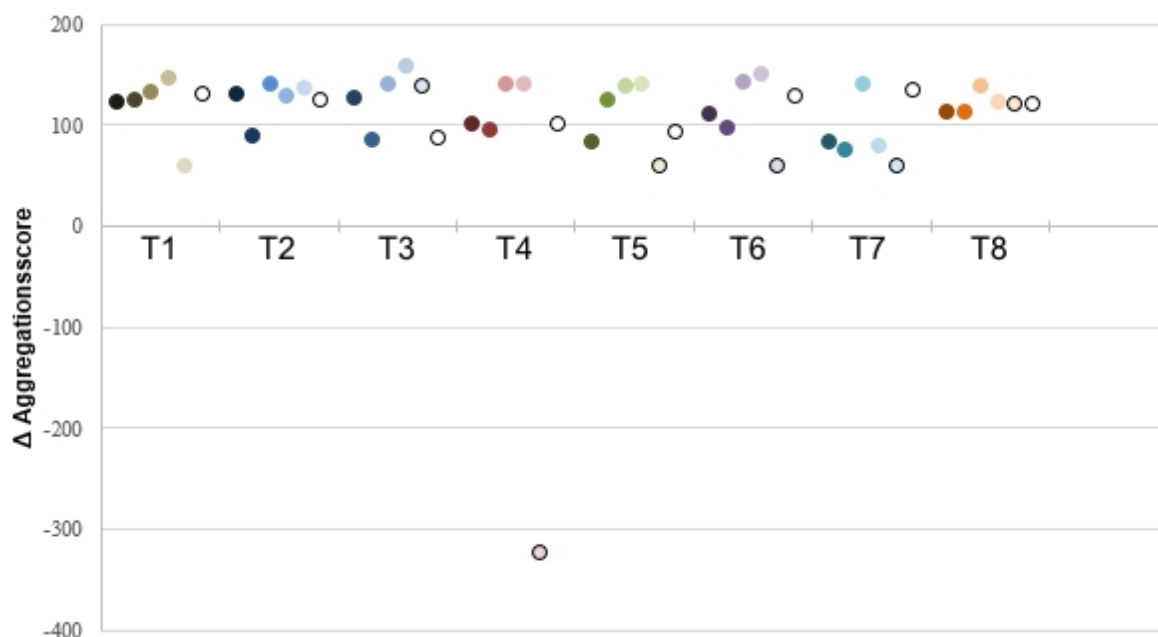


Abbildung 78 Übersicht über die Abnahme des Aggregationsscores (PAP-Score) für die Trastuzumabmodelle T1 bis T8 durch Interaktion mit den *L*-Histidin-Konformeren H1 bis H6 (graduell heller werdende Punkte). Das Modell T4 zeigt eine deutliche Zunahme der Aggregationsneigung für das Konformer H5. Die größte Verringerung des Aggregationsscores kann dem Komplex T3H4 zugeordnet werden.

Die Änderungen des PAP-Scores für *L*-Histidin sind im Durchschnitt aller Komplexmodelle höher als für *L*-Prolin-Komplexe (mittlerer PAP-Score für den Trastuzumab-*L*-Prolinkomplex: 2; für den Trastuzumab-*L*-Histidinkomplex: 105,75), allerdings zeigt sich auch für das T3H4-Komplexmodell eine starke Zunahme der Aggregationsneigung. Diese Zunahme ist nicht eindeutig als Artefakt zu erkennen, da in der Literatur bereits eine mögliche Zunahme der Aggregationsneigung durch *L*-Histidin beschrieben wurde [22]. Die tatsächliche Stabilität dieses Komplexes muss allerdings noch mittels in-vitro-Methoden und MD-Simulationen überprüft werden.

9.5. Stabilitätsuntersuchungen mittels moleküldynamischer Simulation

Aussagen über die Stabilität der modellierten Komplexe und somit deren Relevanz für den Mechanismus der Verringerung der Aggregationsneigung lässt sich aus den Docking-Ansätzen alleine nicht ableiten. Aus diesem Grund wurde exemplarisch mit dem Komplex, der die größte Änderung der Aggregationsneigung zeigte (T2P1), eine MD-Simulation über 1,2 ns durchgeführt und evaluiert.

Zunächst wurden die RMSD-Werte bestimmt. Eine Änderung dieser Werte bis 3 Å ist hierbei akzeptabel, größere Schwankungen können auf eine Änderung der Konformation des Proteins hinweisen [170]. Die Analyse der RMSD-Werte über den simulierten Zeitraum für das Fv-Fragment von Trastuzumab und *L*-Prolin zeigte, dass die Werte für die α -Kohlenstoffatome der Aminosäurereste, des Peptidrückgrats, dieser Aminosäureseitenketten, der Nicht-Wasserstoffatome und des Liganden bezogen auf sich selbst („Lig fit Lig“) nur leicht schwankten (vgl. **Abbildung 79**).

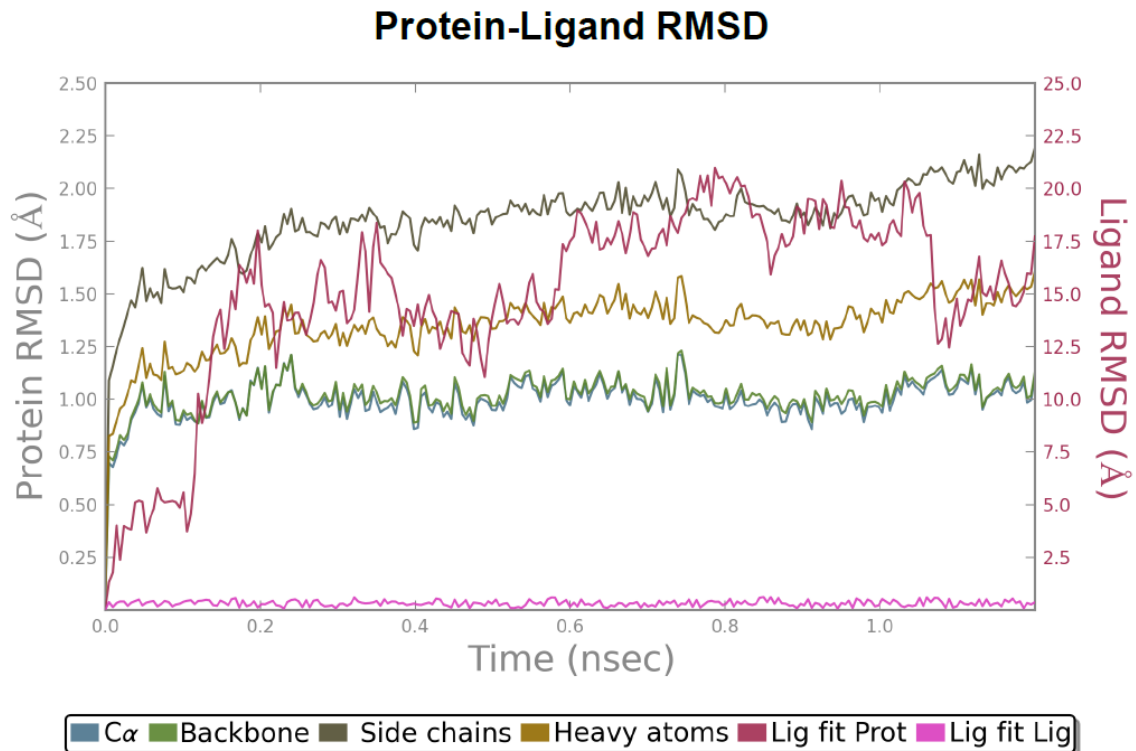


Abbildung 79 Übersicht über den zeitlichen Verlauf der RMSD-Werte für die α -Kohlenstoffatome von Trastuzumab (hellblau), des Peptidrückgrats (hellgrün), der Aminosäureseitenketten (braun), der Nicht-Wasserstoffatome (Ocker), des Trastuzumab-L-Prolin-Komplexes (rot) und von L-Prolin (violett). Nach anfänglichem Anstieg des Wertes bleibt dieser für alle Gruppen mit Ausnahme des Gesamtkomplexes konstant. Das Diagramm wurde mittels BioLuminate® erstellt.

Abbildung 79 zeigt auch, dass der RMSD-Wert des Gesamtkomplexes im Vergleich zu den einzelnen Werten des Fv-Fragmentes und L-Protein stark schwankt. Dies lässt auf eine Änderung der Position des Liganden in der Bindungstasche zurückführen und wird durch den zeitlichen Verlauf der Interaktionen beider Moleküle bekräftigt (**Abbildung 80**).

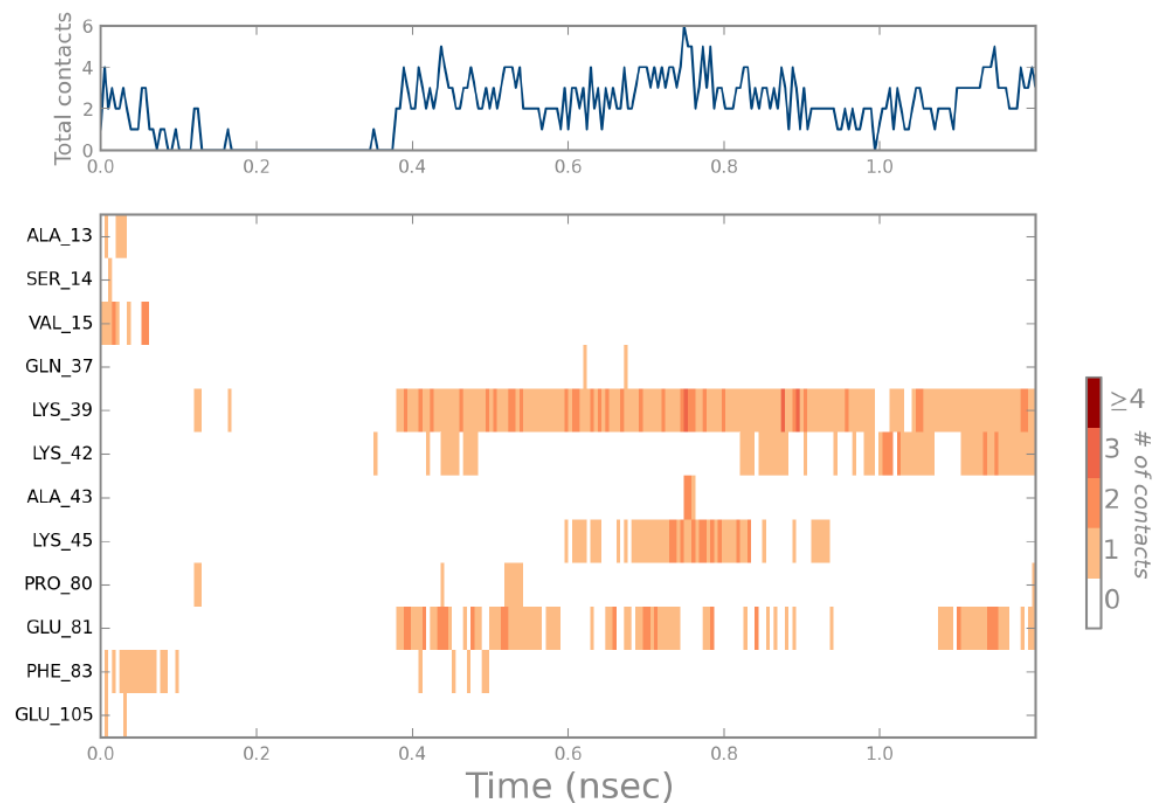


Abbildung 80 Darstellung der Anzahl der Kontakte zwischen dem Liganden (*L*-Prolin) und dem Fv-Fragmentes des Antikörpers Trastuzumab über den simulierten Zeitraum von 2 ns. Der obere Teil der Abbildung zeigt die gesamte Anzahl der Kontakte zu jedem Zeitpunkt der MD-Simulation. Der untere Teil korreliert die Kontakte zwischen *L*-Prolin und den Aminosäureseitenketten (Angabe in Dreibuchstabencode und Nummerierung). Das Diagramm wurde mittels BioLuminate® erstellt.

Die **Abbildung 80** zeigt auch, dass *L*-Prolin nach weniger als 0,2 ns nicht mehr mit den Aminosäureresten der ursprünglichen Bindungstasche interagiert und sich die Art der Interaktionen ändert. Während die Interaktionen vor der MD-Simulationen einen höheren Anteil an Van-der-Waals-Wechselwirkungen besaßen, wurden im zeitlichen Verlauf diese geringer repräsentiert und Wasserstoffbrückenbindungen und Wasserbrücken dominieren (vgl. **Abbildung 81**).

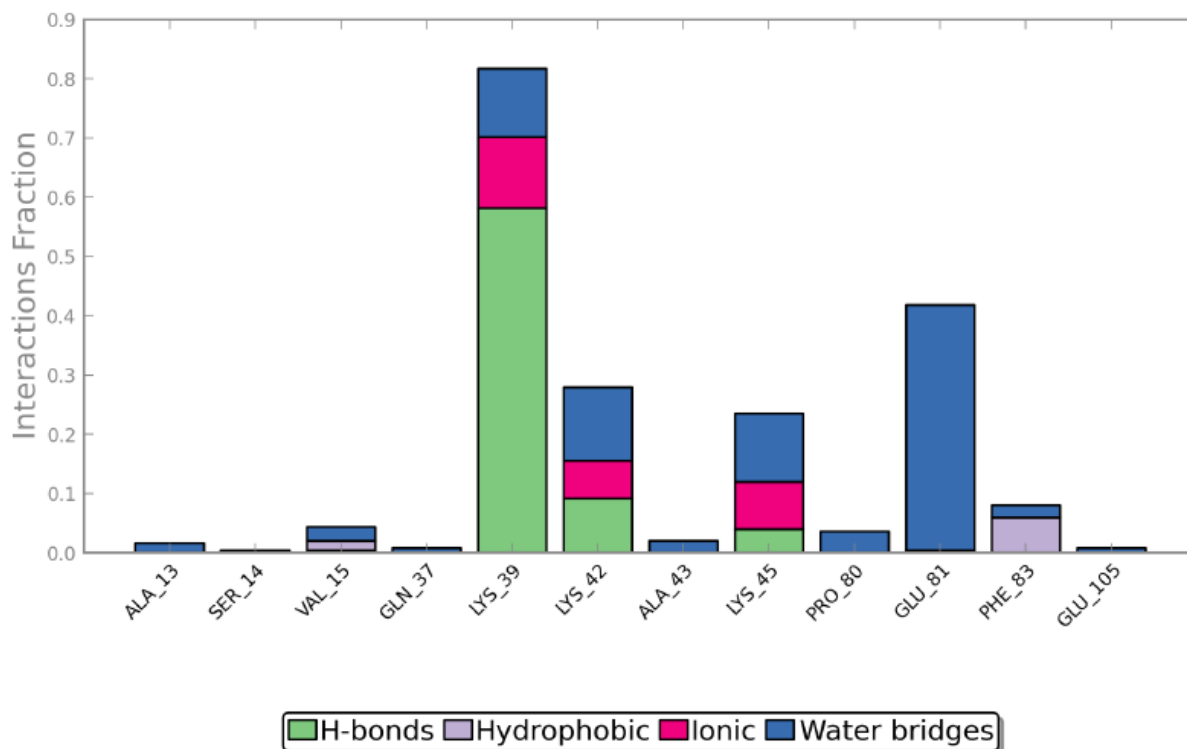


Abbildung 81 Aufgeschlüsselte Übersicht über zeitliche Anteile der Wasserstoffbrücken- (hellgrün), Van-der-Waals- (lila), ionische (rot) und Wasserbrückeninteraktionen zwischen dem Trastuzumabmodell 2 (T2) und dem *L*-Prolinkonformer 1 (P1). Der y-Wert der Balken ist auf die Gesamtlänge der Simulation normalisiert. Auf der x-Achse sind die interagierenden Aminosäurereste aufgetragen (Dreibuchstabencode und Nummerierung). Es ist zu erkennen, dass Wasserbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen, die am häufigsten vorliegenden Interaktionen sind. Das Diagramm wurde mittels BioLuminate® erstellt.

Betrachtet man die schematische Darstellung dieser Interaktionen, so stellt man fest, dass der Hauptanteil der direkten Interaktion von *L*-Prolin auf Lys 39 der leichten Kette entfallen, während Wasserbrücken mit den Aminosäureseitenketten Gly 81 und Lys 45 der leichten Kette vorherrschen. Es ist auch zu erkennen, dass die hydrophoben Anteile des *L*-Prolin-Pyrrolidylrings dem Solvent (Wasser) ausgesetzt ist (vgl. **Abbildung 82**).

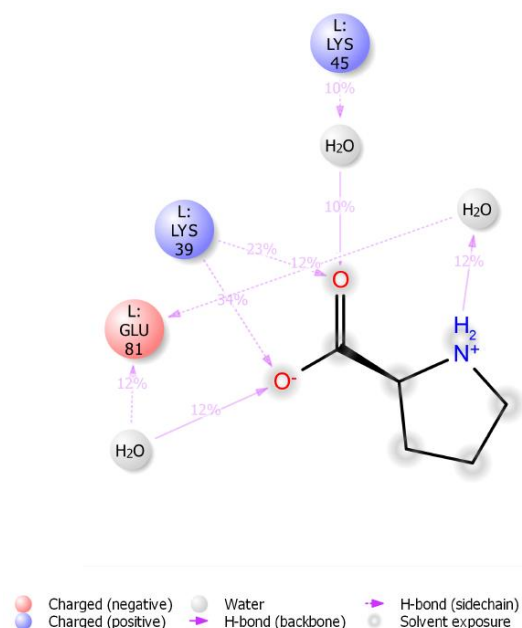


Abbildung 82 Schematische Darstellung der Interaktionen von L-Prolin P1 und Trastuzumabmodell T2. Interagierende Aminosäurereste (Kette: Dreibuchstabencode und Nummerierung) sind entsprechend ihrer Ladung rot (negativ) oder blau (positiv) dargestellt. Lila Pfeile mit Angabe von Prozentzahlen geben Wasserstoffbrückenbindungen und der Anteil des zeitlichen Auftretens gemessen an der Gesamtdauer an. Weiße Kreise mit der Beschriftung „H₂O“ stehen für an den Bindungen involvierte Wassermoleküle. Graue Kreise an dem L-Prolin-Pyrrolidylring weisen auf einen Kontakt mit dem Solvent (Wasser) hin.

Dieses Ergebnis widerspricht den anfänglichen Dockingergebnissen für L-Prolin und man kann daher nicht auf den Stabilisierungsmechanismus schließen. Dieses Untersuchungsergebnis kann durch eine Wiederholung der bisherigen MD-Simulation und experimentelle Stabilitätsüberprüfungen verifiziert oder entkräftet werden. Die Untersuchung der weiteren Komplexe kann zusätzliche Hinweise auf den Stabilisierungsmechanismus geben, die auch mittels in-vitro-Ansätze bestätigt werden können, wie zum Beispiel 2D-Infrarotspektroskopie und „Breitbanddielektrizitätsspektroskopie“ (broadband dielectric spectroscopy), da diese Techniken Aufschluss über die Änderung der Struktur und der Solvatisierung geben [36].

Des Weiteren bietet es sich an den gewählten Ansatz auf die Untersuchungen zu L-Histidin zu übertragen. Mit den aus den MD-Simulationen und der experimentellen Untersuchungen gewonnen Erkenntnissen, kann der Stabilisierungsmechanismus besser beschrieben werden. Die zusätzlichen Daten können Auskunft über die Relevanz der gefundenen Hydrophobizitätserhöhung für den Komplex T4H5 geben. Da hierdurch die Häufigkeit und Dauer des zeitlichen Auftretens evaluiert sowie dessen Einfluss auf die Stabilisierung beurteilen werden kann.

Die erhaltenen Ergebnisse aus beiden Untersuchungsreihen können einen ersten Einblick in die Stabilisierungsmechanismen von Proteinen durch Aminosäuren geben und bringen somit eine rationale Formulierungsentwicklung von flüssigen Antikörperzubereitungen einen Schritt näher.

10. Zusammenfassung

Komplexe aus Proteinen und Peptiden mit Metallionen verhalten sich sehr unterschiedlich. Während die meisten Ansätze eines „Dockens“ von Metallionen an Proteinen bzw. Peptiden vielversprechende Komplexe mit geringen RMSD-Werten lieferten, zeigten sich die meisten Komplexe im Verlaufe einer MD-Simulation als instabil. Lediglich der GAPAG-Ca²⁺-Komplex im Vakuum blieb über den gesamten simulierte Zeitraum stabil, während dieser Komplex im wässrigen Medium innerhalb von 80 ps zerfallen ist. Diese in-silico-Ergebnisse lassen sich mittels unterschiedlicher Komplexierungsmechanismen erklären. Die im Vakuum gefundene CS ist im wässrigen Medium unvorteilhaft, da keine polaren Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Aminosäureresten des Peptids und dem Wasser stattfinden. Auch eine Umfaltung des Peptids mit Exposition des Ca²⁺-Ions gegenüber Wasser führt zu seiner Solvatisierung und somit zu einer weiteren Destabilisation des GAPAG-Ca²⁺-Komplexes (vgl. **Kapitel 6.4.**).

Diese Erkenntnisse spiegeln sich auch in den *in-vitro*-Ergebnissen wieder. Die von Lehmann *et al.* berichteten sequenzspezifischen Bindungseigenschaften konnten allerdings für ein wässriges Medium mittels ACE nicht belegt werden [135, 139] (vgl. **Kapitel 6.3.**).

Ähnlich wie GAPAG zeigte das Peptid D1 kaum Affinitäten zu Metallionen in den ACE-Experimenten (vgl. **Kapitel 8.2.**). Jedoch konnte für die gefundenen Interaktionen mit Ca²⁺- und Cu²⁺-Ionen, Komplexe molekülmechanisch modelliert werden, die akzeptable RMSD-Werte aufwiesen (0,577 Å bzw. 0,566 Å). Durch weiterführende semi-empirische Berechnungen für den D1-Cu²⁺-Komplex konnte eine Änderung an den Ligandenbindungsstellen festgestellt werden, die auf einen Unterschied in den Bindungsmodi für Ca²⁺ und Cu²⁺ schließen lässt und wahrscheinlich auf die nicht molekülmechanisch modellierbaren Chemie des Cu²⁺-Ion zurückzuführen ist (vgl. Amid-Iminol-Tautomerie **Abbildung 73**) [142, 166].

Es wurde auch die D6-Domäne des Proteins AtHIRD11 mittels ACE untersucht, und es zeigten sich Interaktionen mit SeO₃²⁻, Zn²⁺, Mn²⁺, Au³⁺- und Cu²⁺-Ionen. Anschließend wurde versucht, die Wechselwirkungen mit Zn²⁺ und Cu²⁺ durch Modelle zu erklären und Schlüsse über eine mögliche Ligandenbindungsstelle innerhalb AtHIRD11 zu ziehen. Hierbei wurden zusätzlich auch Dimere berücksichtigt, die zwar im intakten Protein durch mögliche sterische Hinderungen bei der Aneinanderlagerung von 2 AtHIRD11-Molekülen weniger wahrscheinlich sind, jedoch bei der Untersuchung des kurzen Peptids *in-vitro* denkbar sind (vgl. **Kapitel 8.3.1.**). Letztendlich wurden ein möglicher Cu²⁺-Komplex (RMSD-Wert: 0,566 Å) und nach semi-empirischer Optimierung zehn Zn²⁺-Komplexe, die nach ihrer Verzerrungsenergie geordnet wurden, ermittelt. Die Cu²⁺-Dimere zeigten jeweils eine Bindungsstelle mit einem hohen (> 0,4 Å) und eine mit einem niedrigen RMSD-Wert. Hingegen konnte bei der Untersuchung der Zn²⁺-Komplexe ein Komplex mit niedrigeren RMSD-Werten gefunden werden (0,3 Å und 0,4 Å; vgl. **Abbildung 83**).

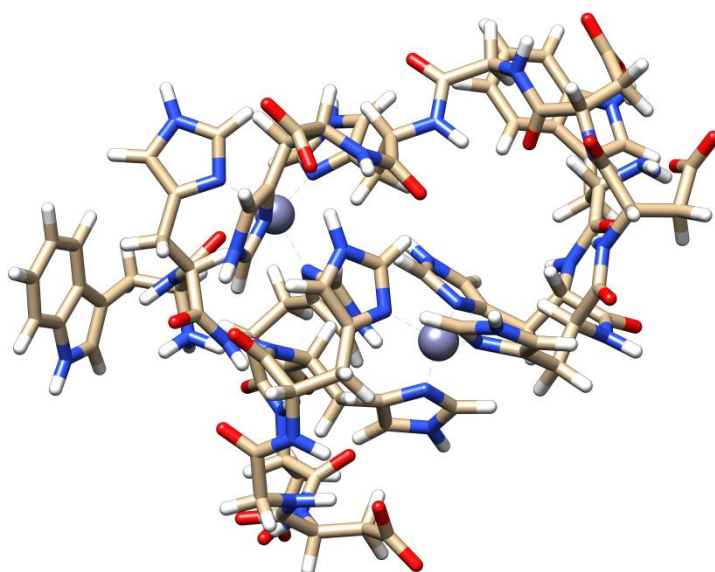


Abbildung 83 Dimerer D6-Zn²⁺-Komplex mit zwei Zn²⁺-Zentren. Die Zentren werden durch ein Zn²⁺-Ion und vier β -Imidazolstickstoffatomen gebildet. Diese werden jeweils von zwei benachbarten *L*-Histidylresten aus jeweils einem der Monomer zur Verfügung gestellt (H2 und H3 bzw. H7 und H8).

Der gefundene, monomere D6-Cu²⁺-Komplex deckte sich nicht mit den gefundenen Cu²⁺-Bindungsstellen in AtHIRD11.

Jedoch zeigte AtHIRD11 vergleichbare Präferenzen für Metallioneninteraktionen im ACE-Versuch und auch einen IDP-Charakter, der sich durch mehrere Peaks für nur Protein in den Elektropherogrammen niederschlug (vgl. **Kapitel 7.2.2.**).

Des Weiteren konnten, durch computerchemische Modellierungen, sechs Cu²⁺-Bindungsstellen am Protein AtHIRD11 identifiziert werden, von denen nach MD-Simulationen zumindest vier sich als stabil erwiesen und ein weiteres Ion noch über ein *L*-Serylrest interagierte (vgl. **Abbildung 84**).

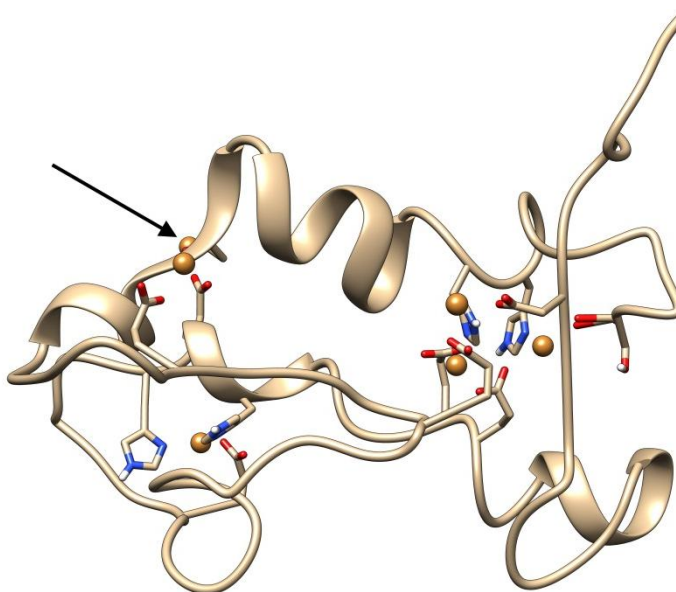


Abbildung 84 AtHIRD11-Cu²⁺-Komplex mit 5 gebundenen Cu²⁺-Ionen nach 1,349 ns. Das Cu²⁺-Ion oben links hinter dem Protein (markiert mit einem schwarzer Pfeil) interagiert nur über einen Ser-Hydroxylsauerstoff.

Das erstellte Modell des Cu²⁺-AtHIRD11-Komplexes spiegelt hierbei nicht nur die ACE-Ergebnisse wieder, sondern ist im Einklang mit den meisten experimentellen Ergebnissen. Um das Modell auf weitere experimentelle Ergebnisse, die den IDP-Charakter beinhalten, zu erweitern, ist eine Beprobung eines größeren Abschnittes des Konformationsraumes nötig und eine daraus folgende Betrachtung des Modells nicht als einzelne Struktur, sondern als Ensemble vieler, wahrscheinlicher Strukturen. Hierbei bietet es sich an, dies für den AtHIRD11-Cu²⁺-Kupferkomplex durchzuführen, da durch die Komplexbildung die Anzahl der möglichen Rotationen um Bindungen und deren Stauchung und Dehnung weitereingeschränkt ist. Somit ergibt sich eine geringere Anzahl an möglichen Konformeren. Nichtsdestotrotz konnten mit Hilfe der ACE-Ergebnisse die Metallionenbindungsstellen genauer beschrieben und daher die Grundlage für diesen Ansatz gelegt werden (vgl. **Kapitel 7.3.1**).

Es konnten die Ergebnisse, die Křížek *et al.* über beeinflussende Interaktionen der Metallionen mit EOF-Markern beschrieben haben, für die verwendeten Konzentrationen und Marker, nicht bestätigt werden [88]. Somit sind die erhaltenen $\Delta R/R_f$ -Werte und Interaktionen nicht fehlerbehaftet aufgrund von Komplexbildungen der EOF-Marker.

Die Migrationszeiten von DMSO und Acetanilid änderten sich bei den Untersuchungen zu den EOF-Markern nicht, allerdings zeigte sich für die als Referenz verwendeten Wasserinjektionen eine Änderung. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob sich diese Änderung nur auf den Wasserpeak auswirkt oder auch auf den Analyten (vgl. **Kapitel 4.3.2.1**).

Jedoch ergänzen ACE-Untersuchungen zu den Metallionenbindungseigenschaften von Peptiden bzw. Proteinen, die mit HOS-Techniken bestimmten strukturellen Charakteristika und erweitern diese durch Informationen zu möglichen Bindungsstellen.

Die „Docking“-Versuche zu den Interaktionen von Trastuzumab mit L-Histidin und L-Prolin zeigen deutlich, dass eine alleinige Betrachtung des starren Modells der Bindung zwischen Hilfsstoff und Antikörper nicht ausreichend ist. Zusätzliche MD-Simulationen und eine in-vitro-Überprüfung ist hierfür unabdingbar. Dies sollte nicht nur zur Überprüfung der Arbeitsthese geschehen, sondern die erhobenen Daten sollten auch einer Verbesserung des Modells dienen (vgl. **Kapitel 9.5**).

Die beschriebene Arbeit zeigt, dass eine Modellentwicklung mittels „higher order structure“-Techniken möglich ist und gewonnene Erkenntnisse durch Ergebnisse der Mobility-Shift-Affinitätskapillarelektrophorese erweitert werden können. Ein gutes Beispiel hierfür ist das Cu²⁺-AtHIRD11-Modell, da es sowohl die experimentell bestimmten Sekundärstrukturen enthält als auch die Bindungseigenschaften teilweise widerspiegelt. Es erklärt auch die beschriebene Notwendigkeit von L-Histidylresten für die Bindung von Cu²⁺-Ionen. Die fehlende Fähigkeit Erdalkalimetallionen zu binden, zeigt sich in der Beschaffenheit der Bindungsstellen. Da Cu²⁺-Ionen sowohl mit harten als auch mit weichen Lewis-Basen interagieren kann und AtHIRD11 keine Interaktion mit harten Lewis-Säuren, wie Erdalkalimetallionen aufweist, lässt sich bereits aus den ACE-Ergebnissen auf eine überwiegende Beteiligung von intermediären oder weichen Lewis-Basen an der Komplexbildung von Metallionen schließen (vgl. **Kapitel 7.3.1**).

Die erhaltenen Modelle sind geeignet, um die meisten Eigenschaften zu beschreiben und Vorhersagen zu machen. Letztendlich sind, zur Bestätigung der Modelle, Untersuchungen mittels strukturgebender Techniken notwendig. Während der GAPAG-Ca²⁺-Komplex im Vakuum eine besondere Herausforderung darstellt, ist dies für die Komplexe der Domänen D1 und D6 mit Hilfe von NMR-Techniken leichter zu meistern. Aufgrund des Diamagnetismus von Ca²⁺ könnte eine ¹H-¹H-„Total Correlation Spectroscopy“- (TOCSY)-NMR-Methode Anwendung finden, die für Komplexe des ebenfalls diamagnetischen Cu⁺-Ions von Ricco *et al.* beschrieben wurden [162].

Für die Cu^{2+} -Komplexe der Peptide D1 und D6 sowie dem Protein AtHIRD11 würden sich, aufgrund des Paramagnetismus des Ions, ^1H - ^{13}C -„Heteronuclear Single Quantum Coherence“- (HSQC-) oder ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Methoden eignen. Hierbei kommt es zu einer transversalen Peakverbreiterung für Atome in räumlicher Nähe des paramagnetischen Ions [162].

Für das Protein AtHIRD11 selbst ist eine Röntgenstrukturanalyse nicht ausreichend, da hier kein Ensemble beschrieben werden kann. In der Literatur sind Techniken, wie SAXS und NMR, als Möglichkeiten die Struktur von IDPs aufzuklären, beschrieben [118].

Letztendlich ist die Strukturaufklärung von Molecular Modelling-Ansätzen, die mittels Homologien zu aufgeklärten Strukturen und Informationen von „higher order structures“-Techniken erstellt wurden, mit Techniken, wie z.B. Röntgenstrukturanalyse, Kernspinresonanzspektroskopie und Kleinwinkel-röntgenstreuung notwendig um die Richtigkeit der Ergebnisse zu verifizieren. Allerdings kann nicht jede dieser Techniken für jede Aufgabenstellung verwendet werden, wie das intrinsisch ungeordnete Protein AtHIRD11 zeigte.

11. Experimenteller Teil

11.1. Instrumentierung und Software für kapillarelektrophoretische Experimente

Die kapillarelektrophoretischen Untersuchungen wurden mit einem PrinCE-C760- (PrinCE Technologies, Emmen, Niederlande), Agilent 1600A- und Agilent 7100 CE-Instrument (beide Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) jeweils mit einem integrierten Dioden-Array-Detektor (DAD) durchgeführt. Das erfasste Spektrum lag zwischen 190 nm und 600 nm für das PrinCE-C760-Gerät. Bei den Untersuchungen mit den Agilent-Geräten wurden nur einzelne Wellenlängen aufgezeichnet. Die Integration der Elektropherogramme wurde für die Interaktionsstudien bei der Wellenlänge 200 nm durchgeführt.

Für die Untersuchungen zu den Wechselwirkungen von GAPAG, D1, D6 und den EOF-Markern mit Metallionen wurde das PrinCE-C760 verwendet. Die ACE-Experimente zu den Interaktionen von AtHIRD11 wurden an der Agilent 1600A-Anlage durchgeführt.

Die kapillargelelektrophoretische Charakterisierung des Proteins AtHIRD11 wurde am Agilent 7100 CE-Instrument durchgeführt und die Elektropherogramme wurden für die Wellenlänge 220 nm aufgezeichnet und ausgewertet.

Zur Aufzeichnung und Integration der Elektropherogramme an der PrinCE-C760 wurde die mitgelieferte Software Dax 3D Version 8.1 (PrinCE Technologies, Emmen, Niederlande) verwendet. Die Auswertung an den Agilent Technologies-Geräten wurde mittels 3D-CE ChemStation Rev. B.04.03-SP1 (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt.

Das verwendete demineralisierte Wasser wurde mittels arium pro® von Sartorius Weighing Technologies GmbH (Göttingen, Deutschland) hergestellt.

Die erhobenen Daten wurden mit Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) weiterverarbeitet und grafisch dargestellt.

Der pH-Wert der Pufferlösungen wurde mit Hilfe des pH-Meters FE20 von Mettler-Toledo (Schwerzenbach, Schweiz) gemessen.

11.2. Kapillaren

Die Experimente an den Kapillarelektrophoresegeräten wurden mit Kapillaren der Firma Polymicro Technologies (Phoenix, USA) durchgeführt. Es wurden für alle Untersuchungen unbeschichtete (bare-fused) Silikatglaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 50 µm und einen Außendurchmesser von 362 µm verwendet.

Die Kapillaren wurden mit einem Glasschneider auf eine Länge von 31 cm (PrinCE-C760) bzw. 30 cm (Agilent 1600A und Agilent 7100 CE) für die AtHIRD11-Experimente zugeschnitten. Mit Hilfe eines Brenners wurde das Detektorfenster ca. 1 cm breit mit der Mitte bei 22,5 cm (bzw. 21,5 cm für AtHIRD11) durch Entfernen der äußeren Polyimidschicht auf der Kapillare freigelegt. Nach dem Einbau in die Geräte wurden die Kapillaren für die ACE-Experimente und die Untersuchungen zu den Interaktionen zwischen Metallionen und EOF-Markern konditioniert. Hierbei wurden sie zuerst mit 1 mol/L NaOH bei 1000 mbar für 40 min gespült. Darauf folgten jeweils ein Spülschritt mit demineralisiertem Wasser (1000 mbar für 10 min) und eine Spülung mit 30 mmol/L Tris-Puffer (2500 mbar für 30 min).

Für die CGE-Versuche wurde ein eigenes Konditionierungsprotokoll verwendet. Hierfür wurde zunächst die Kapillare 10 min mit 0,1 mol/L NaOH gespült, gefolgt von 0,1 mol/L HCl für 5 min, Wasser für 2 min jeweils bei 2000 mbar und dem Beckman Coulter™ Proteome Lab™ SDS MW Gel-Puffer für 10 min bei 4000 mbar.

11.3. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Für die Durchführung der ACE-Experimente wurden Acetanilid, Mangan(II)chlorid, Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA), Bariumchlorid und Natriumdodecylsulfat (SDS) von der Firma Fluka (Steinheim, Deutschland) erworben. Gold(III)chlorid, Nickel(II)chlorid, Selen(IV)chlorid und 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris) wurden über Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Zink(II)chlorid, Strontiumnitrat, Calciumchlorid und 37%ige Salzsäure wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) gekauft. Kupfer(II)chlorid und Natriumthiocyanat wurden von Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland) bezogen. Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde von Acros (Nidderau, Deutschland) erworben. Der verwendete Beckman Coulter™ Proteome Lab™ SDS MW Gel-Puffer wurde von Beckman Coulter (Brea, USA) gekauft.

Das Protein AtHIRD11 wurde vom Labor Masakazu Hara (Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, Shizuoka, Japan) zur Verfügung gestellt. Es wurde gentechnisch durch Exprimierung in Escherichia Coli gewonnen (weitere Spezifikationen siehe **Tabelle 4**). Die Peptide D1 und D6 wurden im Auftrag durch GenScript (Tokyo, Japan) hergestellt (Eigenschaften: **Tabelle 12**)

Tabelle 12 Übersicht über Eigenschaften der Peptidproben der D1- und D6-Domäne

Name	D1	D6
Peptidbestellnummer	367216-1	367216-2
Sequenz	WMAGLINKIGDALHIGGG NKEG	WHHDDGHH
Reinheit [%]	95,2	93,2
Molekulare Masse [Da]	2251,57	1040,01

Zur Filtration der hergestellten Lösungen wurden Rotilab-Spritzenfilter aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

11.3.1. Herstellung der Konditionierungs- und Spüllösungen

Für die Konditionierung der Kapillare wurde eine 1 mol/L NaOH-Lösung verwendet. Diese Lösung wurde durch das Lösen von 40,00 g Natriumhydroxid in einem 1000-mL-Messkolben mit demineralisiertem Wasser hergestellt.

Der erste Spülschritt erforderte eine 0,1 mol/L EDTA in 0,1 mol/L NaOH-Lösung. Für die 0,1 mol/L NaOH-Lösung wurde 10 mL der 1 mol/L NaOH-Lösung in einen 100-mL-Messkolben überführt und mit 90 mL demineralisiertem Wasser aufgefüllt.

In der 0,1 mol/L NaOH-Lösung wurde nun 29,22 g EDTA gelöst.

11.3.2. Pufferherstellung

Für die unterschiedlichen Experimente wurden verschiedene Pufferlösungen verwendet. Während für die Experimente mit GAPAG eine 20 mmol/L Tris-Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet wurde, wurden die Versuche mit den Domänen D1 und D6 sowie dem vollständigen AtHIRD11-Protein mit einer 30 mmol/L Tris-Pufferlösung pH 7,4 durchgeführt.

Der 20 mmol/L Tris-Puffer wurde durch Lösen von 2,42 g Tris in 200 mL demineralisiertem Wasser, mit anschließendem Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 durch 37%ige Salzsäure und Auffüllen im Messkolben auf 1000 mL hergestellt. Die Anfertigung des 30 mmol/L Tris-Puffers verlief analog. Hierbei wurden entsprechend 3,63 g Tris in 200 ml demineralisiertem Wasser gelöst und im Meßkolben auf 1000 mL aufgefüllt.

Für die Untersuchungen zum Einfluss von Metallionen auf EOF-Marker wurde zusätzlich eine Tris-Referenzpufferlösung hergestellt. Hierbei war das Ziel, dass dieser Puffer dieselbe Ionenstärke aufweist, die der 30 mmol/L Tris-Puffer mit 500 µmol/L der Metallsalze aufweist. Daher wurde die eingewogene Menge an Tris für den Tris-Referenzpuffer auf 3,69 g/L erhöht.

Da Zn^{2+} in der Konzentration 50 µmol/L untersucht wurde, musste hierfür auch ein eigener Puffer hergestellt werden. Hierfür wurde 3,681 g Tris im Messkolben auf 1000 mL aufgefüllt.

Der für die CGE-Untersuchungen benötigt Puffer besaß, aufgrund der unterschiedlichen Trenntechniken eine andere Zusammensetzung. Hierfür wurde ein 100 mmol/L Tris-Puffer mit SDS-Zusatz verwendet. Er wurde durch Einwiegen von 1,12 g Tris und 1,00 g SDS in 50 mL demineralisiertem Wasser und anschließendem Anpassen des pH-Wertes auf 8 mittels 1 mol/L HCl hergestellt. Um die gewünschten Konzentrationen der Bestandteile zu erhalten, wurde dieser Ansatz im letzten Schritt auf 100 mL aufgefüllt.

11.3.3. Herstellung der EOF-Marker-Lösungen

Die verwendeten EOF-Marker-Lösungen wurden durch das Lösen von Acetanilid bzw. durch das Hinzupipettieren von DMSO hergestellt.

Die DMSO-Lösung wurde durch Auffüllen von 50,0 µL DMSO mit 30 mmol/L Tris-Puffer auf 25 mL im Messkolben hergestellt.

Für die Untersuchungen mit Acetanilid als EOF-Marker wurde eine Konzentration von 60 µmol/L eingestellt. Dies wurde erreicht durch das Lösen von 6 mg Acetanilid in 100 mL 20 mmol/L Tris-Puffer bzw. 30 mmol/L Tris-Puffer im Messkolben.

11.3.4. Herstellung der Peptid- und Proteinlösungen

Die Probenlösungen wurden auf 1 mg/mL Protein bzw. Peptid eingestellt. Eine Ausnahme bildet hierbei die D1-Domäne, da diese eine schlechtere Löslichkeit aufwies, wurde eine Konzentration von 0,5 mg/mL verwendet.

Die Lösungen wurden hergestellt, indem 0,3 mg Protein bzw. Peptid in ein Eppendorff-Röhrchen eingewogen und der Feststoff mit 0,3 mL Lösung aufgenommen wurde. Die Lösung wurde mit Hilfe der Rotilab-Spritzenfilter vorfiltriert, da das Volumen der Protein- bzw. Peptidlösung zu gering zum Filtrieren ist und ein Großteil des Proteins am Filter adsorbieren könnte.

Bei der Lösung zur Aufnahme des Proteins handelte es sich, je nach Versuchsaufbau, um 30 mmol/L Tris-Puffer oder die beschriebene Acetanilid-Lösung bzw. für die CGE-Untersuchungen um den 100 mmol/L Tris-Puffer.

11.3.5. Herstellung der metallionenhaltige Pufferlösungen

(Hintergrundelektrolytlösungen)

Die Herstellung der metallionenhaltigen Pufferlösungen erfolgte in mehreren Stufen. Zunächst wurde die entsprechende Menge an Metallsalz in 25 mL Tris-Puffer gelöst, so dass eine 5 mmol/L Lösung des Metallions entstand (Ausnahme: AuCl_3 hier wurde nur eine 1 mmol/L hergestellt), danach wurde diese mit Tris-Puffer auf 250 bzw. 500 $\mu\text{mol/L}$ in 10-mL-Messkolben verdünnt. Auch hier bildete ZnCl_2 eine Ausnahme, die Lösung wurde auf 25 $\mu\text{mol/L}$ bzw. 50 $\mu\text{mol/L}$ verdünnt.

Diese Lösungen wurden für die Untersuchungen vor der Verwendung mittels 0,22 μm Spritzenfilter von Schwebeteilchen, die die Kapillare blockieren könnten, befreit.

11.4. Verwendete kapillarelektrophoretische Methoden

Die untersuchten Peptide und das Protein AtHIRD11 wiesen sehr unterschiedliche Eigenschaften auf, D1 wies eine schlechte Löslichkeit auf, während AtHIRD11 mehrere Peaks besaß, die dieser Substanz zugeordnet werden konnten. Daher konnte für diese Anwendungen keine universelle Methode verwendet werden. Aus diesem Grund wurden die Parameter der Methoden individuell für die Probe geändert bzw. durch zusätzliche Techniken, wie die CGE ergänzt. Als Ausgangsmethode für die affinitätskapillarelektrophoretischen Untersuchungen diente die von Alhazmi *et al.* beschriebene Methode, die an die Analyten angepasst wurde [61].

11.4.1. Methoden der GAPAGPLIVPY-Experimente

Die Analysemethode für das GAPAG-Peptid bestand aus 5 Schritten, nämlich der Reinigung der Kapillare von Peptid- und Kationenanlagerungen (1. Schritt), der Anpassung der Kapillare auf den Deprotonierungsgrad der Kapillarinnenwand vor dem Spülschritt (2. Schritt), der Equilibrierung mit der Hintergrundanalytlösung (3. Schritt), der Injektion des Analyten (4. Schritt) und der eigentlichen Analyse als letztem Schritt (vgl.

Tabelle 13).

Diese Analyse wurde sowohl mit dem Peptid als auch mit der reinen 60 µmol/L Acetanilid-Lösung jeweils 6-mal für die beiden untersuchten Metallionenkonzentrationen und dem 20 mmol/L Tris-Puffer bei 23°C durchgeführt. Die Verwendung der reinen Acetanilid-Lösung erfolgte nur im Tris-Puffer direkt vor der Untersuchung eines weiteren Metallions und diente der Überprüfung des EOF auf Veränderungen. Zusätzlich wurde nach jedem 18. Lauf die Kapillare für 30 min mit Tris-Puffer bei 2500 mbar gespült.

Die Vermessung der Metallionen erfolgte durch anfängliche Analyse der geringen Konzentration gefolgt von der nächst höheren und anschließend dem Wechsel des Metallions. Um Einwirkungen von Ablagerungen an Metallionen an die Kapillareninnenwand zu verringern, wurden zunächst die Erdalkalimetallionen (Reihenfolge: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} und Sr^{2+}) und anschließend die Nebengruppenelemente inklusive SeO_3^{2-} (Reihenfolge: SeO_3^{2-} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Au^{3+}) untersucht.

Tabelle 13 Übersicht über die einzelnen Schritte mit verwendeten Lösungen, Dauer der Einzelschritte, verwendeten Drücken und angelegte Spannung. Die Bezeichnung EDTA steht für die unter 11.3.1. beschriebene Lösung von 0,1 mol/L EDTA in 0,1 mol/L NaOH. Mit Analyt wird die Lösung des Peptids bzw. die EOF-Marker-Lösung bezeichnet. BGE bezeichnet, je nach Analyse, den beschriebenen Tris-Puffer oder eine Lösung eines verwendeten Metallsalzes in diesem Puffer.

Schritt	Einlassgefäß	Auslassgefäß	Zeit [s]	Druck [mbar]	Spannung [kV]
1.	EDTA	Leer	60	2500	-
2.	Wasser	Leer	60	2500	-
3.	BGE	Leer	90	2500	-
4.	Analyt	Leer	4,8	50	-
5.	BGE	BGE (halbgefüllt)	300	-	10

11.4.2. Methoden der D1- und D6-Domänenuntersuchungen

Die Experimente zu den Interaktionen der Domänen D1 und D6 wurden mit dem PrinCE-C760-Gerät durchgeführt. Auch hier wurde die Kapillare, wie unter 11.4.1. beschrieben, vor dem ersten Gebrauch konditioniert und die Trennungen bei 23°C durchgeführt. Die fünf Schritte wurden, um die Präzision der Migrationszeiten zu erhöhen, um einen weiteren Schritt direkt nach der Injektion des Analyten ergänzt. Es wurde die Probenzone mit dem BGE des letzten Schrittes von der Spitze der Kapillare weiter in ihr Inneres verschoben. Des Weiteren wurde für die Untersuchung von D1 die Spannung auf 15 kV erhöht und das Injektionsvolumen vervierfacht (doppelte Zeit und Druck). Dies geschah um die Integration der Peaks zu erleichtern (vgl. **Tabelle 14**).

Es wurde auch ein Versuchsdesign gewählt, in dem die Migrationszeiten des Peptids und des EOF-Markers in getrennten Läufen evaluiert wurde, um Überlappungen der Peaks auszuschließen.

Tabelle 14 Übersicht über die einzelnen Schritte mit verwendeten Lösungen, Dauer der Einzelschritte, verwendeten Drücken und angelegter Spannung für die Untersuchung der Interaktionen von D1. Die Bezeichnung EDTA steht für die unter 11.3.1. beschriebene Lösung von 0,1 mol/L EDTA in 0,1 mol/L NaOH. Mit Analyt wird die Lösung des Peptids bzw. des EOF-Markers bezeichnet. BGE bezeichnet, je nach Analyse, den beschriebenen Tris-Puffer oder eine Lösung eines verwendeten Metallsalzes in diesem Puffer.

Schritt	Einlassgefäß	Auslassgefäß	Zeit [s]	Druck [mbar]	Spannung [kV]
1.	EDTA	Leer	60	2500	-
2.	Wasser	Leer	60	2500	-
3.	BGE	Leer	90	2500	-
4.	Analyt	Leer	9,6	100	-
5.	BGE	Leer	4,8	50	-
6.	BGE	BGE (halbgefüllt)	300	-	15

Für D6 wurde das Spülprotokoll optimiert, indem sowohl die Dauer des ersten als auch des dritten Schrittes erhöht wurde. Dadurch sollte die Menge an gebundenem Metallion an der Kapillareninnenwand weiter reduziert und durch den längeren BGE-Spülschritt der Deprotonierungsgrad auf pH 7,4 äquilibriert werden, so dass dieser während der Trennung konstant bleibt. Auch die injizierte Probenmenge wurde durch eine Halbierung des Injektionsdruckes reduziert (vgl. **Tabelle 15**).

Es fand auch bei beiden Peptiden ein zusätzlicher Spülschritt mit Tris-Puffer für 30 min bei 2500 mbar nach jeweils 12 Läufen statt.

Tabelle 15 Übersicht über die einzelnen Schritte mit verwendeten Lösungen, Dauer der Einzelschritte, verwendeten Drücken und angelegter Spannung für die Untersuchung der Interaktionen von D6. Die Bezeichnung EDTA steht für die unter 11.3.1. beschriebene Lösung von 0,1 mol/L EDTA in 0,1 mol/L NaOH. Mit Analyt wird die Lösung des Peptids bzw. des EOF-Markers bezeichnet. BGE bezeichnet, je nach Analyse, den beschriebenen Tris-Puffer oder eine Lösung eines verwendeten Metallsalzes in diesem Puffer.

Schritt	Einlassgefäß	Auslassgefäß	Zeit [s]	Druck [mbar]	Spannung [kV]
1.	EDTA	Leer	150	2500	-
2.	Wasser	Leer	60	2500	-
3.	BGE	Leer	120	2500	-
4.	Analyt	Leer	4,8	25	-
5.	BGE	Leer	2,4	50	-
6.	BGE	BGE (halbgefüllt)	300	-	10

11.4.2. Methoden der AtHIRD11-Experimente

Obwohl der Aufbau der Methode der AtHIRD11-Untersuchungen sehr große Ähnlichkeiten zu der Methode der D6-Experimente zeigt, sind kleine Unterschiede in der Spüldauer des 3. Schrittes, der Injektion und des Verschiebens der Probenzone zu erkennen (vgl. **Tabelle 15** und **Tabelle 16**). Auch wurde ein anderes Gerät verwendet, das eine andere Eingabe der Parameter erfordert und einen anderen Maximaldruck erreichen kann. Während die Untersuchungen von GAPAG, D1 und D6 am PrinCE-C760-Gerät durchgeführt wurden, wurde für AtHIRD11 das Agilent 1600A-Instrument verwendet. Das Agilent-Gerät benötigt eine Eingabe des Zeitintervalls für die Injektion in natürlichen Zahlen als Sekunden während das PrinCE-Gerät die Intervalle in Minuten als Dezimalzahlen erfordert, somit treten Ungenauigkeiten durch das Runden auf (Verschieben der Probenzone) bzw. die Injektionsdauer wurde für eine bessere Auswertung optimiert (**Tabelle 16**). Auch hier wurde die Kapillare nach jeweils 40 Läufen zusätzlich für 30 min mit Tris-Puffer bei 2000 mbar gespült.

Tabelle 16 Übersicht über die einzelnen Schritte mit verwendeten Lösungen, Dauer der Einzelschritte, verwendeten Drücken und angelegter Spannung für die Untersuchung der Interaktionen von AtHIRD11. Die Bezeichnung EDTA steht für die unter 11.3.1. beschriebene Lösung von 0,1 mol/L EDTA in 0,1 mol/L NaOH. Mit Analyt wird die Lösung des Peptids bzw. des EOF-Markers bezeichnet. BGE bezeichnet, je nach Analyse, den beschriebenen Tris-Puffer oder eine Lösung eines verwendeten Metallsalzes in diesem Puffer.

Schritt	Einlassgefäß	Auslassgefäß	Zeit [s]	Druck [mbar]	Spannung [kV]
1.	EDTA	Leer	150	2500	-
2.	Wasser	Leer	60	2500	-
3.	BGE	Leer	90	2500	-
4.	Analyt	Leer	6	50	-
5.	BGE	Leer	2	50	-
6.	BGE	BGE (halbgefüllt)	300	-	10

Es wurde auch, um die Zusammensetzung der AtHIRD11-Probe zu bestimmen, eine mehrstufige CGE-Methode verwendet (**Tabelle 17**). Hierfür wurde das Agilent 7100 CE-Instrument verwendet.

Tabelle 17 Übersicht über die einzelnen Schritte mit verwendeten Lösungen, Dauer der Einzelschritte, verwendete Drücke und angelegter Spannung für die Untersuchung der AtHIRD11-Probenzusammensetzung.

Schritt	Einlassgefäß	Auslassgefäß	Zeit [s]	Druck [mbar]	Spannung [kV]
1.	0,1 mol/L NaOH	Leer	180	4.000	-
2.	0,1 mol/L HCl	Leer	60	4.000	-
3.	Wasser	Leer	60	4.000	-
4.	Gel-Puffer	Leer	600	4.000	-
5.	Probe	Leer	4	1.000	-
6.	Gel-Puffer	Gel-Puffer	1.500	2.000 (beide Seiten der Kapillare)	-16,5

11.4.3. Methoden zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen EOF-Markern und Metallionen

Für die Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen den EOF-Markern Acetanilid bzw. DMSO mit unterschiedlichen Metallionen wurde eine vergleichbare Methode wie die Methoden für GAPAG und AtHIRD11 verwendet. Da man keine Proteinwechselwirkungen zu erwarten waren, wurden die Zeitintervalle der Spülschritte reduziert und die Zeit für die Separation gekürzt.

Tabelle 18 Übersicht über die einzelnen Schritte mit verwendeten Lösungen, Dauer der Einzelschritte, verwendeten Drücken und angelegter Spannung für die Untersuchung der Interaktionen der EOF-Marker Acetanilid und DMSO. Die Bezeichnung EDTA steht für die unter 11.3.1. beschriebene Lösung von 0,1 mol/L EDTA in 0,1 mol/L NaOH. Mit Analyt wird eine Lösung des EOF-Markers (Acetanilid oder DMSO) bezeichnet. BGE bezeichnet, je nach Analyse, den beschriebenen Tris-Referenzpuffer oder eine Lösung eines verwendeten Metallsalzes in Tris-Puffer.

Schritt	Einlassgefäß	Auslassgefäß	Zeit [s]	Druck [mbar]	Spannung [kV]
1.	EDTA	Leer	60	2500	-
2.	Wasser	Leer	60	2500	-
3.	BGE	Leer	90	2500	-
4.	Analyt	Leer	6	25	-
5.	BGE	Leer	2,4	50	-
6.	BGE	BGE (halbgefüllt)	180	-	10

11.5. Auswertung der kapillarelektrophoretischen Untersuchungen

Die unterschiedliche Herangehensweise an die Untersuchung der Wechselwirkung von Metallionen mit Proteinen bzw. Peptiden und der EOF-Marker spiegelt sich auch in der Auswertung wieder.

Die Auswertung der EOF-Marker-Interaktion verlief im Vergleich zu den ACE-Versuchen mit Proteinen und Peptiden verhältnismäßig einfach. Hierbei wurden Veränderungen in der Migrationszeit in Anwesenheit und Abwesenheit der Metallionensalze bestimmt. Dazu wurde abwechselnd der untersuchte EOF-Marker und Wasser injiziert. Da das Wasser insgesamt neutral geladen ist, wandert es in der Zone für neutrale Moleküle und gibt somit Auskunft, ob der EOF-Marker ebenfalls in dieser Zone wandert oder in einem geladenen Komplex vorliegt. Im nächsten Schritt wurde die Migrationszeit des Markers auf die des Wassers, im entsprechenden BGE, adjustiert, um der Eigenmobilität des EOF-Markers entgegen wirken zu können (**Formel 11-1**). Anschließend wurde die angepasste Zeit des Peakmaximums verwendet um mittels Differenzbildung zwischen den berechneten Zeiten in Abwesenheit und Anwesenheit der Metallionen den Einfluss der Ionen zu bestimmen (**Formel 11-2**). Die

Ergebnisse wurden hier auch mit Konfidenzintervallen für den Fall $\alpha = 5 \%$ (Irrtumswahrscheinlichkeit) angegeben (**Formel 11-3**) [171].

$$t_{adj} = t_{EOF} - t_{H_2O}$$

Formel 11-1

t_{adj} : Adjustierte Migrationszeit [s]

t_{EOF} : Migrationszeit des EOF-Markers [s]

t_{H_2O} : Migrationszeit des negativen Wasserpeaks [s]

$$\Delta t = t_i - t_f$$

Formel 11-2

Δt : Migrationszeitunterschied [s]

t_i : Adjustierte Migrationszeit des EOF-Markers in Anwesenheit von Metallionen [s]

t_f : Adjustierte Migrationszeit des EOF-Markers in Abwesenheit von Metallionen [s]

$$cnf(\Delta t) = t_i - t_f \pm t_{\alpha/2, n_i + n_f - 2} * \sigma_{Gesamt} \sqrt{\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_f}}$$

Formel 11-3

Δt : Migrationszeitunterschied [s]

t_i : Adjustierte Migrationszeit des EOF-Markers in Anwesenheit von Metallionen [s]

t_f : Adjustierte Migrationszeit des EOF-Markers in Abwesenheit von Metallionen [s]

n_i : Anzahl der unabhängigen Messungen der Migrationszeit des EOF-Markers in Anwesenheit von Metallionen im Puffer

n_f : Anzahl der unabhängigen Messungen der Migrationszeit des EOF-Markers in Abwesenheit von Metallionen im Puffer

$t_{\alpha/2, n_i + n_f - 2}$: Quantile der t -Verteilung für Anzahl der Freiheitsgrade $n_i + n_f - 2$

σ_{Gesamt} : Gesamtfehler

Der benötigte Gesamtfehler (σ_{Gesamt}) lässt sich mit Hilfe der Gauss'schen Fehlerfortpflanzung aus den Fehlern der einzelnen Messgrößen berechnen (**Formel 11-4**).

$$\sigma_{Gesamt} = \sqrt{\left(\frac{\partial \Delta t}{\partial t_{i,EOF}} * \sigma_{t_{i,EOF}}\right)^2 + \left(\frac{\partial \Delta t}{\partial t_{f,EOF}} * \sigma_{t_{f,EOF}}\right)^2 + \left(\frac{\partial \Delta t}{\partial t_{i,H_2O}} * \sigma_{t_{i,H_2O}}\right)^2 + \left(\frac{\partial \Delta t}{\partial t_{f,H_2O}} * \sigma_{t_{f,H_2O}}\right)^2}$$

Formel 11-4

- Δt : Migrationszeitunterschied [s]
- t_i : Adjustierte Migrationszeit des EOF-Markers in Anwesenheit von Metallionen [s]
- t_f : Adjustierte Migrationszeit des EOF-Markers in Abwesenheit von Metallionen [s]
- $\sigma_{t_{f,EOF}}$: Standardabweichung von t bei der Messung des EOF-Markers in Abwesenheit von Metallionen [s]
- $\sigma_{t_{i,EOF}}$: Standardabweichung von t bei der Messung des EOF-Markers in Anwesenheit von Metallionen [s]
- $\sigma_{t_{i,H_2O}}$: Standardabweichung von t bei der Messung des Wasser-Peaks in Anwesenheit von Metallionen [s]
- $\sigma_{t_{f,H_2O}}$: Standardabweichung von t bei der Messung des Wasser-Peaks in Abwesenheit von Metallionen [s]

Somit lässt sich über den Wert Δt und sein Konfidenzintervall entscheiden, ob eine signifikante Veränderung der Migration des EOF-Markers durch Interaktionen mit Metallionen stattfand.

Eine andere Herangehensweise ist bei der Bestimmung des $\Delta R/R_f$ -Wertes zu beobachten. Dieser besteht nicht nur aus einer einfachen Differenz zwischen Migrationszeit in Anwesenheit und Abwesenheiten eines Interaktionspartners, sondern es findet auch eine Normalisierung der Migrationszeit des Analyten auf einen EOF-Marker statt (**Formel 11-5**).

$$R = \frac{t_{EOF}}{t_{Analyt}}$$

Formel 11-5

- R : Normalisierte Migrationszeit des Analyten
- t_{EOF} : Migrationszeit des EOF-Markers [s]
- t_{Analyt} : Migrationszeit des Analyt [s]

In einem letzten Schritt wird die Differenz zwischen dem R-Wert in Gegenwart des Interaktionspartners (R_i) und in Abwesenheit (R_f) ein weiteres Mal normalisiert. Dies geschieht durch Bildung des Quotienten zwischen der beschriebenen Differenz (ΔR) und des R_f -Wertes (**Formel 11-6**).

$$\frac{\Delta R}{R_f} = \frac{R_i - R_f}{R_f}$$

Formel 11-6

$\frac{\Delta R}{R_f}$: Wert, der Aussage über Stärke der Interaktion und Ladungsänderung macht

t_{EOF} : Migrationszeit des EOF-Markers [s]

t_{Analyt} : Migrationszeit des Analyt [s]

Auch in diesem Fall wurde der $\Delta R/R_f$ -Wert nicht alleine betrachtet, sondern es liegt den bewerteten Ergebnissen ein Konfidenzintervall mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % zugrunde (**Formel 11-3**)

Diese Gleichung ändert sich für den Fall von AtHIRD11, da hier der EOF-Marker nicht in der Analytlösung enthalten war, sondern die Migrationszeiten in eigenen Messreihen bestimmt wurden. In diesem Fall werden 4 Messreihen in der Gleichung berücksichtigt und es ergibt sich **Formel 11-7**.

$$cnf\left(\frac{\Delta R}{R_f}\right) = \frac{\Delta R}{R_f} \pm t_{\alpha/2, \sum_1^i (n_i) - i} * \sigma_{Gesamt} \sqrt{\sum_1^i \frac{1}{n_i} / R_f}$$

Formel 11-7

$\frac{\Delta R}{R_f}$: Wert, der Aussage über Stärke der Interaktion und Ladungsänderung macht

n_i : Anzahl der unabhängigen Messungen einer Messreihe (Peptid bzw. EOF-Marker mit und ohne Ligand)

$t_{\alpha/2, \sum_1^i (n_i) - i}$: Quantile der t -Verteilung für Anzahl der Freiheitsgrade aller Messreihen

σ_{Gesamt} : Gesamtfehler

R_f : Normalisierte Migrationszeit in Abwesenheit des Liganden

Auch hier setzt sich der Gesamtfehler aus den Messungenauigkeiten der Migrationszeiten der einzelnen Peaks wie folgt zusammen:

$$\sigma_{Gesamt} = \sqrt{\left(\frac{\partial \frac{\Delta R}{R_f}}{\partial t_{f,EOF}} * \sigma_{t_{f,EOF}}\right)^2 + \left(\frac{\partial \frac{\Delta R}{R_f}}{\partial t_{i,EOF}} * \sigma_{t_{i,EOF}}\right)^2 + \left(\frac{\partial \frac{\Delta R}{R_f}}{\partial t_{f,Analyt}} * \sigma_{t_{f,Analyt}}\right)^2 + \left(\frac{\partial \frac{\Delta R}{R_f}}{\partial t_{i,Analyt}} * \sigma_{t_{i,Analyt}}\right)^2}$$

Formel 11-8

σ_{Gesamt} : Gesamtfehler

$\frac{\Delta R}{R_f}$:	Wert, der Aussage über Stärke der Interaktion und Ladungsänderung macht
$t_{f,EOF}$:	Migrationszeit des EOF-Markers in Abwesenheit von Metallionen [s]
$t_{i,EOF}$:	Migrationszeit des EOF-Markers in Anwesenheit von Metallionen [s]
$t_{f,Analyt}$:	Migrationszeit des Analyten in Abwesenheit von Metallionen [s]
$t_{i,Analyt}$:	Migrationszeit des Analyten in Anwesenheit von Metallionen [s]
$\sigma_{t_{f,EOF}}$:	Standardabweichung von t bei der Messung des EOF-Markers in Abwesenheit von Metallionen [s]
$\sigma_{t_{i,EOF}}$:	Standardabweichung von t bei der Messung des EOF-Markers in Anwesenheit von Metallionen [s]
$\sigma_{t_{i,H_2O}}$:	Standardabweichung von t bei der Messung des Wasser-Peaks in Anwesenheit von Metallionen [s]
$\sigma_{t_{f,H_2O}}$:	Standardabweichung von t bei der Messung des Wasser-Peaks in Abwesenheit von Metallionen [s]

Die so erhaltenen mittleren $\Delta R/R_f$ -Werte mit ihren Konfidenzintervallen wurden zur Entscheidung, ob eine Wechselwirkung vorliegt oder nicht, herangezogen. Dazu wurde die Annahme, dass Wechselwirkungen bei Werten über 0,01 bzw. unter -0,01 signifikant sind von Redweik *et al.* übernommen [7]. Des Weiteren wurde der Betrag des Wertes zur Bewertung der Stärke der Interaktion verwendet und das Vorzeichen um zu entscheiden, ob der Komplex im Vergleich zum ungebundenen Protein negativer (negatives Vorzeichen) oder positiver (positives Vorzeichen) geladen ist. Die Signifikanz des $\Delta R/R_f$ -Wertes ist zur Bewertung, ob eine Wechselwirkung vorhanden ist, nur die Vorbedingung. Um sicher zu sein, dass eine Interaktion vorliegt, darf das Konfidenzintervall den Wert 0 nicht einschließen. Für den Fall, dass dieser Wert eingeschlossen wird, könnte eine Wechselwirkung ohne Änderung des Größen-Ladungsverhältnisses vorliegen. Dies ist aber im Falle von Protein- und Peptidwechselwirkungen mit hochgeladenen Teilchen wie anorganischen Kationen nicht der Fall, da die Zunahme des effektiven Radius im Vergleich zur Ladungsänderung vernachlässigbar klein ist.

Da für die CGE-Untersuchungen keine Größenkalibrierung vorgenommen wurde und die Peakflächen nur in Relation zu einander betrachtet wurden, wurden die Migrationszeiten nur für die qualitativen Aussagen über Anzahl der Spezies in der Analytlösung und die Flächen nur zur Bestimmung der Hauptkomponente verwendet.

11.6. Instrumentierung und Software für computerchemische Untersuchungen

Die computerchemischen Berechnungen wurden an einem Hewlett-Packard-PC mit vier 64-Bit-kompatible Intel® Core™ i5-3750 CPUs (insgesamt 3,40 GHz), 8 GB RAM und einer GeForce GT 630-Grafikkarte mit 6 GB RAM durchgeführt.

Die molekülmechanische Geometrieoptimierung und Erstellung der Komplex-Modelle erfolgte mittels HyperChem™ 8.0.10 (Hypercube Inc., Gainesville, USA) [99]. Für die semi-empirischen Berechnungen wurde MOPAC2012 bzw. MOPAC2016 (James Stewart, Colorado Springs, USA) verwendet [172]. Die

Überführung der Darstellung der einzelnen Atome in ein Peptid-Modell wurde mit Gabedit 2.4.9 (Université de Lyon, Lyon, Frankreich) durchgeführt [173]. Die Bestimmung der Geometrien an den Bindungsstellen, die Clusteranalysen, die Visualisierungen der Komplexe und der MD-Simulationen wurden mit Chimera 1.11rc (San Francisco, USA) ausgeführt [174].

Die MD-Simulationen für die unterschiedlichen Komplexe wurden mit Hilfe von GROMACS 5.1 (Science for Life Laboratory, Stockholm, Schweden) berechnet [159].

Für die Berechnungen und die Darstellungen zu den Fv-Antikörperfragmenten wurde die BioLuminate™ Suite (Schrödinger, New York, USA) verwendet [170].

Die graphische Darstellung der berechneten Zahlenwerte für die Kapillarelektrophorese-Ergebnisse wurde mittels Excel 2010 erstellt.

11.7. Computerchemische Untersuchungen

Die Entwicklung von in-silico-Modellen bedarf vieler unterschiedlicher Funktionen. Ein Teil der verwendeten Software ist direkt für die Erstellung vorgesehen, aber auch zur Bestimmung der Qualität des Modells werden unterschiedliche Programme verwendet.

11.7.1. Methoden zur Modellerstellung

Die ersten Modelle der kleinen Peptide D1- und D6-Domäne sowie GAPAG wurden vollständig mittels HyperChem erstellt. Hierzu wurde die Funktion der „Restrains“ (dt.: Zwänge) verwendet. Durch diese Funktion konnte der Komplex, mittels Geometrieoptimierung und Verwendung des AMBER96 Kraftfeldes, in eine Form gezwungen werden, die den Bindungslängen und -winkeln der Data-mining-Ergebnisse von Harding *et al.* und Zheng *et al.* entsprachen [64, 65, 175].

Für die Optimierung wurden die distanzabhängigen Parameter so gewählt, dass die Dielektrizitätskonstante bei 1 F/m liegt und die Konstante für die elektrostatischen Kräfte bei 0,833 Vm/(Ås) sowie die Van-der-Waals-Kraftkonstante bei 0,5 N. Im Anschluss wurde der Zwang langsam reduziert und mittels RMSD-Wert überprüft, ob der modellierte Komplex noch den Anforderungen der möglichen Geometrien entsprach. Diese Bedingung wurde als erfüllt angesehen, wenn der Komplex einen RMSD-Wert unter 0,3 Å bei fehlenden Zwängen aufwies.

Für die Evaluation des RMSD-Wertes wurde das Programm Chimera 1.11rc verwendet [174]. Während die Cu²⁺- bzw. Zn²⁺-Komplexe von D1 und D6 weiter semi-empirisch mittels MOPAC2016 unter Verwendung des PM7-Kraftfeldes mit molekülmechanischer Korrektur der Peptidbindungen optimiert wurde, wurde GAPAG direkt im Anschluss auf die Komplexstabilität untersucht [176]. Für die semi-empirischen Modellierungen wurde das Konzept einer uneingeschränkten Hartree-Fock-Berechnung ohne Verwendung von Basissätzen zugrunde gelegt. Des Weiteren wurden Zwei-Elektronenintegrale nur bis zu einer Entfernung der Elektronen von 1 Å gelöst.

Anschließend wurden die RMSD-Werte wieder bestimmt und Komplexe, die noch der Bedingung eines Wertes von unter 0,3 Å entsprachen, nach ihrer inneren Energie geordnet und bewertet. Hierbei wurden Komplexe mit einer niedrigen inneren Energie als stabiler und somit wahrscheinlicher betrachtet.

Für das Erstellen des AtHIRD11-Cu²⁺-Modells wurde aufgrund der höheren Proteinstrukturen eine andere Modellierungsstrategie gewählt. Es wurde das Programm MOE verwendet und eine Proteinstrukturvorlage für ein erstes Modell, das im Weiteren mittels GROMACS 5.1 und dem Kraftfeld GROMOS54a8 verbessert wurde. Anschließend wurde die Qualität mittels Betrachtung und Abbildung des Modells im Ramachandran-Plot bewertet. Darauf folgte das Hinzufügen der Cu²⁺-Ionen nach den

Gesichtspunkten von Harding *et al.* und Zheng *et al.* und die Überprüfung der Stabilität mittels kurzer MD-Simulation t (**Tabelle 20**) [64, 65, 174]. Nachdem keine Cu²⁺-Ionen mehr hinzugefügt werden konnten, wurde die Qualität des Modells überprüft.

11.7.2. Methoden zur Qualitätsprüfung von computerchemischen Modellen

Die Überprüfung der Qualität erfolgte nicht ausschließlich durch die Auswertung des Ramachandran-Plots, sondern auch durch die Ermittlung der Stabilität mittels MD-Simulation. Diese Simulationen wurden an die Aufgabenstellungen angepasst (**Tabelle 19** und **Tabelle 20**). Hierbei wurden die Stabilitätsuntersuchungen zu GABAG im Vakuum und in Wasser zusätzlich zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse bei der MS- und der ACE-Untersuchung verwendet. Die modellierten Komplexe wurden als stabil betrachtet, wenn im untersuchten Zeitraum kein Ion dissoziiert war.

Tabelle 19 Übersicht über verwendete Parameter für die Äquilibrationssimulation und die Simulationen im Vakuum und in Wasser.

	Äquilibrationssimulation	Simulation im Vakuum	Simulation in Wasser
Zeitschritt	2 fs	2 fs	2 fs
Probenzugfrequenz	0,5 ps	1 ps	1 ps
Anzahl an Einzelstrukturen	41	200.001	1.001
Softwarepaket	GROMACS 5.1	GROMACS 5.1	GROMACS 5.1
Ensemble	<i>NVT</i> (kanonisches Ensemble)	<i>NVT</i> (kanonisches Ensemble)	<i>NpT</i> (Isotherm – isobar)
Thermostat	„V-rescale“, 300 K	„V-rescale“, 300 K	Berendsen, 300 K
Thermostat-relaxationszeit	0,1	0,1	0,1
Barostat	-	-	Berendsen (isotrop), 1 bar
Barostat-relaxationszeit	-	-	1,0
Handhabung der Grenzflächen	„Periodic boundary conditions“	„Periodic boundary conditions“	„Periodic boundary conditions“
Elementarzellenform	kubisch	kubisch	kubisch
Kraftfeld	GROMOS 53a7	GROMOS 53a7	GROMOS 53a7
Solvent	Wasser / keines	keines	Wasser
Solventkraftfeld	SPC / keines	keines	SPC
Behandlung von Elektrostatischen Wechselwirkungen	Abgeschnitten nach 1 nm	Abgeschnitten nach 1 nm	Abgeschnitten nach 1 nm

Tabelle 20 Übersicht über verwendete Parameter zur Äquilibration, der kurzen Stabilitätsüberprüfung nach dem Hinzufügen von Cu²⁺-Ionen, der 2-ns-MD-Simulation und der 14-ns-Simulation für AtH1RD11.

	Äquilibrationssimulation	Kurze Stabilitätsüberprüfung	2-ns-Simulation	14-ns-Simulation
Zeitschritt	2 fs	2 fs	2 fs	2 fs
Probenzugfrequenz	1 ps	1 ps	1 ps	1 ps
Anzahl an Einzelstrukturen	501	101	2.001	14.001
Softwarepaket	GROMACS 5.1	GROMACS 5.1	GROMACS 5.1	GROMACS 5.1
Ensemble	<i>NpT</i> (Isotherm – isobar)	<i>NpT</i> (isotherm – isobar)	<i>NpT</i> (Isotherm – isobar)	<i>NpT</i> (Isotherm – isobar)
Thermostat	„V-rescale“, 300 K	„V-rescale“, 300 K	„V-rescale“, 300 K	„V-rescale“, 300 K
Thermostatrelaxationszeit	0,1	0.1	0.1	0.1
Barostat	Berendsen	Parrinello-Rahman (isotrop), 1 bar	Parrinello-Rahman (isotrop), 1 bar	Parrinello-Rahman (isotrop), 1 bar
Barostatrelaxationszeit	1,0	2.0	2.0	2.0
Handhabung der Grenzflächen	„Periodic boundary conditions“	„Periodic boundary conditions“	„Periodic boundary conditions“	„Periodic boundary conditions“
Elementarzellenform	kubisch	kubisch	kubisch	kubisch
Kraftfeld	GROMOS 54a8	GROMOS 54a8	GROMOS 54a8	GROMOS 54a8
Solvent	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser
Solventkraftfeld	SPC	SPC	SPC	SPC
Behandlung von Elektrostatischen Wechselwirkungen	Abgeschnitten nach 1 nm	Abgeschnitten nach 1 nm	Abgeschnitten nach 1 nm	Abgeschnitten nach 1 nm

12. Literaturverzeichnis

1. Low, T.Y. & Heck A.J.R. Reconciling proteomics with next generation sequencing. *Curr Opin Chem Biol* 30: 14–20 (2015) doi:10.1016/j.cbpa.2015.10.023.
2. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic acids research* 43: D204-12 (2015) doi:10.1093/nar/gku989.
3. Berman, H.M. The Protein Data Bank. *Nucleic acids research* 28: 235–42 (2000) doi:10.1093/nar/28.1.235.
4. Narhi, L.O. *Biophysics for Therapeutic Protein Development*. New York, NY: Springer New York (2013)
5. Kranz, J., AlAzzam, F., Saluja, A., Svitel, J. & Al-Azzam, W. Techniques for Higher-Order Structure Determination. Erschienen in: Narhi, L.O. *Biophysics for Therapeutic Protein Development*. New York, NY: Springer New York; 33–82 (2013) doi:10.1007/978-1-4614-4316-2_3.
6. Wang, W., Nema S. & Teagarden, D. Protein aggregation—pathways and influencing factors. *International Journal of Pharmaceutics* 390: 89–99 (2010) doi:10.1016/j.ijpharm.2010.02.025.
7. Redweik, S., Xu, Y. & Wätzig, H. Precise, fast, and flexible determination of protein interactions by affinity capillary electrophoresis: Part 1: Performance. *Electrophoresis* 33: 3316–22 (2012).
8. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. & Gatto, G.J. *Biochemie*. 7. Auflage Berlin: Springer Spektrum (2013).
9. Voet D., Voet, J.G., Pratt, C.W. & Beck-Sickinger, A.G. *Lehrbuch der Biochemie*. Weinheim: Wiley-VCH (2002).
10. Campbell, N.A., Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V. & Jackson, R.B. *Campbell Biologie*. 10. Auflage. Hallbergmoos: Pearson (2016).
11. Purves, W.K., Sadava, D., Held, A., Markl, J. *Biologie*. 9. Auflage Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag (2011).
12. Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz, M. & Roth, H.J. *Medizinische Chemie: Targets - Arzneistoffe - chemische Biologie*. 2. Auflage. Stuttgart: Dt. Apotheker-Verlag (2010).
13. Mutschler, E. *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie*. 10. Auflage. Stuttgart: WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft (2013).
14. Cole, C., Barber, J.D. & Barton, G.J. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic acids research* 36: 201 (2008).
15. Némethy, G. & Printz, M.P. The γ Turn, a Possible Folded Conformation of the Polypeptide Chain. Comparison with the β Turn. *Macromolecules* 5: 755–8 (1972). doi:10.1021/ma60030a017.
16. Kumar, S. & Bansal, M. Structural and sequence characteristics of long alpha helices in globular proteins. *Biophys. J.* 71: 1574-1586 (1996).
17. Toniolo, C., Crisma, M., Moretto, A., Peggion, C., Formaggio, F., Alemán, C., Cativiela, C., Ramakrishnan, C. & Balaram, P. Peptide delta-Turn: Literature Survey and Recent Progress. *Chemistry* 21: 13866–77 2015. doi:10.1002/chem.201501467.
18. Pal, M. & Dasgupta, S. The nature of the turn in omega loops of proteins. *Proteins* 51: 591–606 (2003). doi:10.1002/prot.10376.
19. Fetrow, J.S. Omega loops: nonregular secondary structures significant in protein function and stability. *FASEB J* 9: 708–17 (1995).
20. Schütt, C. & Bröker, B. *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg.: Spektrum Akademischer Verlag (2011).

-
21. Boehncke, W.-H. & Radeke, H.H. *Biologics in General Medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2007).
 22. Wang, W., Singh, S., Zeng, D.L., King, K. & Nema, S. Antibody structure, instability, and formulation. *J Pharm Sci* 96: 1–26 (2007). doi:10.1002/jps.20727.
 23. de Goeij, B.E. & Lambert, J.M. New developments for antibody-drug conjugate-based therapeutic approaches. *Curr Opin Immunol* 40: 14–23 (2016). doi:10.1016/j.coi.2016.02.008.
 24. Murphy, K.M., Travers, P., Walport, M., Janeway, C.A., Ehrenstein, M. & Seidler, L. *Janeway Immunologie*. 7. Auflage Berlin: Springer Spektrum; 2014.
 25. Teplyakov, A., Luo, J., Obmolova, G., Malia, T.J., Sweet, R., Stanfield, R.L., Kodangattil, S., Almagro, J.C. & Gilliland, G.L. Antibody modeling assessment II. Structures and models. *Proteins* 82: 1563–82 (2014). doi:10.1002/prot.24554.
 26. Absolute Antibody Ltd. Antibody structure. <http://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-overview/antibody-structure/>. Aufgerufen am 26. Mai 2016.
 27. Liu, H., Gaza-Bulseco, G., Faldu, D., Chumsae, C. & Sun, J. Heterogeneity of monoclonal antibodies. *J Pharm Sci* 97: 2426–47 (2008). doi:10.1002/jps.21180.
 28. Agrawal, N.J., Kumar, S., Wang, X., Helk, B., Singh, S.K. & Trout, B.L. Aggregation in protein-based biotherapeutics: computational studies and tools to identify aggregation-prone regions. *J Pharm Sci* 100: 5081–95 (2011). doi:10.1002/jps.22705.
 29. Nichols, G., Byard, S., Bloxham, M.J., Botterill, J., Dawson, N.J., Dennis, A., Diart, V., North, N. C. & Sherwood J.D. A review of the terms agglomerate and aggregate with a recommendation for nomenclature used in powder and particle characterization. *J Pharm Sci* 91: 2103–9 (2002). doi:10.1002/jps.10191.
 30. International Organization for Standardization. Sample preparation - Dispersing procedures for powders in liquids. Genf (2000).
 31. Vlasak, J. & Ionescu, R. Fragmentation of monoclonal antibodies. *mAbs* 3: 253–63 (2014). doi:10.4161/mabs.3.3.15608.
 32. Rakow, T., El Deeb, S., Hahne, T., Abd El-Hady, D., Albishri, H.M. & Wätzig, H. Investigating effects of sample pretreatment on protein stability using size-exclusion chromatography and high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *Journal of Separation Science* 37:2583–90 (2014). doi:10.1002/jssc.201400189.
 33. Falconer, R.J., Chan, C., Hughes, K. & Munro, T.P. Stabilization of a monoclonal antibody during purification and formulation by addition of basic amino acid excipients. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86: 942–8 (2011). doi:10.1002/jctb.2657.
 34. Wang, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* 185: 129–88 (1999). doi:10.1016/S0378-5173(99)00152-0.
 35. Zheng, J.Y. & Janis, L.J. Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298. *International Journal of Pharmaceutics* 308: 46–51 (2006). doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.024.
 36. Kamerzell, T.J., Esfandiary, R., Joshi, S.B., Middaugh, C.R. & Volkin, D.B. Protein-excipient interactions: mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. *Adv Drug Deliv Rev* 63: 1118–59 (2011). doi:10.1016/j.addr.2011.07.006.
 37. Gokarn, Y.R., Fesinmeyer, R.M., Saluja, A., Razinkov, V., Chase, S.F., Laue, T.M. & Brems, D.N. Effective charge measurements reveal selective and preferential accumulation of anions, but not cations, at the protein surface in dilute salt solutions. *Protein Sci.* 20: 580–7 (2011). doi:10.1002/pro.591.

-
38. Schweizer, D., Schonhammer, K., Jahn, M. & Gopferich, A. Protein-polyanion interactions for the controlled release of monoclonal antibodies. *Biomacromolecules* 14: 75–83 (2013). doi:10.1021/bm301352x.
39. Schneider, C.P. & Trout, B.L. Investigation of cosolute-protein preferential interaction coefficients: new insight into the mechanism by which arginine inhibits aggregation. *J Phys Chem B* 113: 2050–8 (2009). doi:10.1021/jp808042w.
40. Auton, M., Bolen, D.W. & Rosgen, J. Structural thermodynamics of protein preferential solvation: osmolyte solvation of proteins, aminoacids, and peptides. *Proteins* 73: 802–13 (2008). doi:10.1002/prot.22103.
41. Zangi, R., Zhou, R. & Berne, B.J. Urea's action on hydrophobic interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 1535–41 (2009). doi:10.1021/ja807887g.
42. Hua, L., Zhou, R., Thirumalai, D. & Berne, B.J. Urea denaturation by stronger dispersion interactions with proteins than water implies a 2-stage unfolding. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16928–33 (2008). doi:10.1073/pnas.0808427105.
43. Carpenter, J.F. & Crowe, J.H. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* 25: 244–55 (1988).
44. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Quality of biotechnological products: Stability testing of biotechnological/biological products Q5C 30. Genf (1995).
45. Fekete, S., Gassner, A.-L., Rudaz, S., Schappler, J. & Guillarme, D. Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 42: 74–83 (2013). doi:10.1016/j.trac.2012.09.012.
46. Fekete, S., Guillarme, D., Sandra, P. & Sandra, K. Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Anal Chem* 88:480–507 (2016). doi:10.1021/acs.analchem.5b04561.
47. Murphy, B.M., Zhang, N., Payne, R.W., Davis, J.M., Abdul-Fattah, A.M., Matsuura, J.E., Herman, A.C. & Manning, M. C. Structure, stability, and mobility of a lyophilized IgG1 monoclonal antibody as determined using second-derivative infrared spectroscopy. *J Pharm Sci* 101: 81–91 (2012). doi:10.1002/jps.22753.
48. Abbas, S.A., Gaspar, G., Sharma, V.K., Patapoff, T.W. & Kalonia, D.S. Application of second-derivative fluorescence spectroscopy to monitor subtle changes in a monoclonal antibody structure. *J Pharm Sci* 102: 52–61 (2013). doi:10.1002/jps.23354.
49. Joshi, V., Shivach, T., Yadav, N. & Rathore, A.S. Circular dichroism spectroscopy as a tool for monitoring aggregation in monoclonal antibody therapeutics. *Anal Chem* 86:11606–13 (2014). doi:10.1021/ac503140j.
50. Cianciulli, C., Hahne, T. & Wätzig, H. Capillary gel electrophoresis for precise protein quantitation. *Electrophoresis* 33: 3276–80 (2012). doi:10.1002/elps.201200177.
51. Salas-Solano, O., Babu, K., Park, S.S., Zhang, X., Zhang, L., Sosic, Z., Bourmajny, B., Zeng, M., Cheng, K.-C., Reed-Bogan, A., Cummins-Bitz, S., Michels D.A., Parker, M., Bonasia, P., Hong, M., Cook, S. Ruesch, M., Lamb, D., Boylan, D., Kiessig, Steffen, Allender, D. & Nunnally B. Intercompany Study to Evaluate the Robustness of Capillary Isoelectric Focusing Technology for the Analysis of Monoclonal Antibodies. *Chromatographia* 73: 1137–44 (2011). doi:10.1007/s10337-011-2017-3.
52. Salas-Solano, O., Kennel, B., Park, S.S., Roby, K., Sosic, Z., Boumajny, B., Free, S., Reed-Bogan, A., Michels, D., McElroy, W., Bonasia, P., Hong, M., He, X., Ruesch, M., Moffatt, F., Kiessig, S. & Nunnally, B. Robustness of iCIEF methodology for the analysis of monoclonal antibodies: an

-
- interlaboratory study. *Journal of Separation Science* 35: 3124–9 (2012).
doi:10.1002/jssc.201200633.
53. Shi, W. & Chance, M.R. Metallomics and metalloproteomics. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 3040–8 (2008).
54. Shi, W. & Chance, M.R. Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization. *Curr Opin Chem Biol* 15: 144–8 (2011).
55. Roberts, E.A. & Sarkar, B. Metalloproteomics: focus on metabolic issues relating to metals. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 17: 425–30 (2014). doi:10.1097/MCO.000000000000085.
56. Lynes, M.A., Kang, Y.J., Sensi, S.L., Perdrizet, G.A. & Hightower, L.E. Heavy metal ions in normal physiology, toxic stress, and cytoprotection. *Ann N Y Acad Sci* 1113: 159–72 (2007).
doi:10.1196/annals.1391.010.
57. Cotruvo, Jr., J. A. & Stubbe, J. Metallation and mismetallation of iron and manganese proteins in vitro and in vivo: The class i ribonucleotide reductases as a case study. *Metallomics* 4: 1020–36 (2012).
58. Yu, Z., Yang, X. & Wang, K. Metal ions induced heat shock protein response by elevating superoxide anion level in HeLa cells transformed by HSE-SEAP reporter gene. *Toxicology* 223: 1–8 (2006). doi:10.1016/j.tox.2006.02.021.
59. Cepeda, V., Fuertes, M., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C. & Perez, J. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *ACAMC* 7: 3–18 (2007). doi:10.2174/187152007779314044.
60. Riedel E. *Anorganische Chemie*. 6. Auflage. Berlin: de Gruyter (2004).
61. Alhazmi, H.A., Nachbar, M., Albishri, H.M., Abd El-Hady, D., Redweik, S., El Deeb, S. & Wätzig, H. A comprehensive platform to investigate protein-metal ion interactions by affinity capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 107: 311–7 (2015).
doi:10.1016/j.jpba.2015.01.017.
62. Janiak, C., Riedel, E. & Meyer, H.-J. *Riedel, moderne anorganische Chemie*. 4. Auflage. Berlin, Boston: de Gruyter (2012).
63. Holleman, A.F., Wiberg, E. & Wiberg, N. *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. 91. Auflage. Berlin: de Gruyter (1985).
64. Harding, M.M. The geometry of metal-ligand interactions relevant to proteins. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 55: 1432–43 (1999).
65. Zheng, H., Chruszcz, M., Lasota, P., Lebioda, L. & Minor, W. Data mining of metal ion environments present in protein structures. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102: 1765–76 (2008).
doi:10.1016/j.jinorgbio.2008.05.006.
66. Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G.L., Thornton, J.M. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem* 13: 1205–18 (2008).
doi:10.1007/s00775-008-0404-5.
67. Ubbink, M., Ejdebäck, M., Karlsson, B.G. & Bendall, D.S. The structure of the complex of plastocyanin and cytochrome f, determined by paramagnetic NMR and restrained rigid-body molecular dynamics. *Structure* 6: 323–35 (1998). doi:10.1016/S0969-2126(98)00035-5.
68. Hart, P.J., Balbirnie, M.M., Ogihara, N.L., Nersissian, A.M., Weiss, M.S., Valentine, J.S., Eisenberg, D. A structure-based mechanism for copper-zinc superoxide dismutase. *Biochemistry* 38: 2167–78 (1999). doi:10.1021/bi982284u.
69. Markl, J. Evolution of molluscan hemocyanin structures. *Biochim Biophys Acta* 1834: 1840–52 (2013). doi:10.1016/j.bbapap.2013.02.020.
70. Albishri, H.M., El Deeb, S., AlGarabli, N., AlAstal R., Alhazmi, H.A., Nachbar, M., Abd El-Hady, D. & Wätzig, H. Recent advances in affinity capillary electrophoresis for binding studies. *Bioanalysis* 6: 3369–92 (2014). doi:10.4155/BIO.14.261.

-
71. Chu, Y.-H., Avila, L.Z., Gao, J. & Whitesides, G.M. Affinity Capillary Electrophoresis. *Accounts of Chemical Research* 28: 461–8 (1995).
72. Tanaka, Y. & Terabe, S. Estimation of binding constants by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* 768: 81–92 (2002). doi:10.1016/S0378-4347(01)00488-1.
73. Petersen, J.R. & Mohammad, A.A. *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*. Totowa: Humana Press (2001).
74. Rundlett, K.L. & Armstrong, D.W. Examination of the origin, variation, and proper use of expressions for the estimation of association constants by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 721: 173–86 (1996). doi:10.1016/0021-9673(95)00774-1.
75. Brechtel, R., Hohmann, W., Rüdiger, H. & Wätzig H. Control of the electroosmotic flow by metal-salt-containing buffers. *Journal of Chromatography A* 716: 97–105 (1995).
76. Kler, P.A., Sydes, D. & Huhn, C. Column-coupling strategies for multidimensional electrophoretic separation techniques. *Anal Bioanal Chem* 407: 119–38 (2015). doi:10.1007/s00216-014-8099-7.
77. Kohl, F.J., Sanchez-Hernandez, L. & Neusüss, C. Capillary electrophoresis in two-dimensional separation systems: Techniques and applications. *Electrophoresis* 36: 144–58 (2015). doi:10.1002/elps.201400368.
78. Gey, M.H. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen*. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag (2008).
79. Neubert, R., Rüttinger, H.-H. *Affinity capillary electrophoresis in pharmaceuticals and biopharmaceuticals*. New York: Marcel Dekker (2003).
80. Yu, H., Xu, X., Sun, J. & You, T. Recent progress for capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Open Chemistry* 10 (2012). doi:10.2478/s11532-012-0005-6.
81. Busch, M., Carels, L.B., Boelens, H., Kraak, J.C. & Poppe, H. Comparison of five methods for the study of drug–protein binding in affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 777: 311–28 (1997). doi:10.1016/S0021-9673(97)00369-5.
82. El Deeb, S., Wätzig, H., Abd El-Hady, D., Albishri, H.M., de Griend, C.S.-V. & Scriba, G.K.E. Recent advances in capillary electrophoretic migration techniques for pharmaceutical analysis. *Electrophoresis* 35: 170–89 (2014).
83. El-Hady, D., Kühne, S., El-Maali, N. & Wätzig, H. Precision in affinity capillary electrophoresis for drug–protein binding studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 52: 232–41 (2010). doi:10.1016/j.jpba.2009.12.022.
84. Bal, W., Sokołowska, M., Kurowska, E. & Faller, P. Binding of transition metal ions to albumin: Sites, affinities and rates. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1830: 5444–55 (2013).
85. Ferreira, C.M.H., Pinto, I.S.S., Soares, E.V. & Soares, H.M.V.M. (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions – a review. *RSC Adv* 5: 30989–1003 (2015). doi:10.1039/c4ra15453c.
86. Fischer, B.E., Häring, U.K., Tribolet, R. & Sigel, H. Metal Ion/Buffer Interactions: Stability of Binary and Ternary Complexes Containing 2-Amino-2(hydroxymethyl)-~l3, -propanediol (Tris) and Adenosine 5'-Triphosphate (ATP). *European Journal of Biochemistry* 523–30 (1979).
87. Hanlon, D.P., Watt, D.S. & Westhead, E.W. The interaction of divalent metal ions with tris buffer in dilute solution. *Analytical Biochemistry* 16: 225–33 (1966). doi:10.1016/0003-2697(66)90150-3.
88. Křížek, T., Kubičková, A., Hladílková, J., Coufal, P., Heyda, J. & Jungwirth, P. Electrophoretic mobilities of neutral analytes and electroosmotic flow markers in aqueous solutions of Hofmeister salts. *Electrophoresis* 35: 617–24 (2014).
89. Abraham, M.J., van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B. & the GROMACS development team. *GROMACS: User Manual version 5.0.6*; 2015.

-
90. Ramachandran, K.I., Deepa, G., Namboori, K. Computational chemistry and molecular modeling: Principles and applications. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag (2008).
 91. Watson, J.D. & Crick, F.H.C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171: 737–8 (1953). doi:10.1038/171737a0.
 92. Comba, P., Hambley, T.W. & Martin B. Molecular Modeling of Inorganic Compounds. 3. Auflage. Hoboken: Wiley-VCH (2009).
 93. Johnson, Q.R., Lindsay, R.J., Petridis, L. & Shen, T. Investigation of Carbohydrate Recognition via Computer Simulation. *Molecules* 20: 7700–18 (2015). doi:10.3390/molecules20057700.
 94. Hinchliffe, A. Molecular modelling for beginners. Chichester: Wiley (2006).
 95. Atkins, P.W. & de Paula, J. Atkins' Physical chemistry. 10. Auflage. Oxford, New York: Oxford University Press (2014).
 96. Allen, M.P. Computational soft matter: From synthetic polymers to proteins; Winter School, 29. Februar – 6. März 2004, Gustav-Stresemann-Institut, Bonn, Germany. Jülich: NIC (2004).
 97. Asset Management Consulting Corporation. Calculation of Lennard-Jones (6-12) potential. http://www.saecanet.com/20100716/saecanet_calculation_page.php?pagenumber=585. Aufgerufen am 5. Mai 2016.
 98. Meller, J. Encyclopedia of Life Science: Molecular Dynamics. London: nature publishing group (2001). doi:10.1038/npg.els.0003048.
 99. Froimowitz, M. HyperChem™: A software package for computational chemistry and molecular modeling (1993).
 100. Senn, H.M. & Thiel, W. QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48: 1198–229 (2009). doi:10.1002/anie.200802019.
 101. Wichmann, E.H. Quantenphysik. 3. Auflage. Braunschweig: Vieweg (1989).
 102. Holzner, S. & Freudenstein, R. Quantenphysik für Dummies 2. Auflage. Weinheim: Wiley (2013).
 103. Heisenberg, W. Die „Beobachtbaren Größen“ in der Theorie der Elementarteilchen. *Z. Physik* 120:513–38 (1943). doi:10.1007/BF01329800.
 104. Born, M. & Oppenheimer, R. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Ann. Phys.* 389: 457–84 (1927). doi:10.1002/andp.19273892002.
 105. Koch, W. & Holthausen, M.C. A chemist's guide to density functional theory. 2. Auflage. Weinheim, New York: Wiley-VCH (2001).
 106. Hohenberg, P. & Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* 136: B864-B871 (1964). doi:10.1103/PhysRev.136.B864.
 107. Kohn, W. & Sham, L.J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.* 140:A1133-A1138 (1965). doi:10.1103/PhysRev.140.A1133.
 108. Stewart, J. J. P. Application of the PM6 method to modeling proteins. *J Mol Model* 15:765–805 (2009). doi:10.1007/s00894-008-0420-y.
 109. Bikadi, Z. & Hazai, E. Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. *J Cheminform* 1: 15 (2009). doi:10.1186/1758-2946-1-15.
 110. Wu, Y., Tepper, H.L. & Voth, G.A. Flexible simple point-charge water model with improved liquid-state properties. *J. Chem. Phys.* 124:24503 (2006). doi:10.1063/1.2136877.
 111. Zielkiewicz, J. Structural properties of water: Comparison of the SPC, SPCE, TIP4P, and TIP5P models of water. *J. Chem. Phys.* 123: 104501 (2005). doi:10.1063/1.2018637.
 112. Dreizler, R.M., Lüdde, C.S. Theoretische Physik 4: Statistische Mechanik und Thermodynamik. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum (2016).
 113. Grotendorst, J. Quantum simulations of complex many-body systems: from theory to algorithms: Winter school, 25. Februar – 1. März 2002, Rolduc Conference Centre, Kerkrade; Lecture notes. Jülich: NIC-Secretariat (2002).

-
114. Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., DiNola, A. & Haak, J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81: 3684 (1984). doi:10.1063/1.448118.
115. Hoover, W.G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A* 31: 1695–7 (1985). doi:10.1103/PhysRevA.31.1695.
116. van Gunsteren, W.F. & Mark, A.E. Validation of molecular dynamics simulation. *J. Chem. Phys.* 108:6109 (1998). doi:10.1063/1.476021.
117. Murdock, S.E., Tai, K., Ng, M.H., Johnston, S., Wu, B., Fangohr, H., Laughton, C.A., Essex, J.W. & Sansom, M.S.P. Quality Assurance for Biomolecular Simulations. *J Chem Theory Comput* 2: 1477–81 (2006). doi:10.1021/ct6001708.
118. Fu, B., Vendruscolo, M. Structure and dynamics of intrinsically disordered proteins. Erschienen in Felli, I.C. & Pieratelli, R. *Intrinsically Disordered Proteins Studied by NMR Spectroscopy*. 1. Auflage. Cham: Springer International Publishing (2015).
119. Daura, X., Gademann, K., Jaun, B., Seebach, D., van Gunsteren, W.F. & Mark, A.E. Peptide Folding: When Simulation Meets Experiment. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38:236–40 (1999). doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19990115)38:1/2<236::AID-ANIE236>3.0.CO;2-M.
120. Velankar, S., van Ginkel, G., Alhroub, Y., Battle, G.M., Berrisford, J.M., Conroy, M.J., Dana, J.M., Gore, S.P., Gutmanas, A., Haslam, P., Hendrickx, P.M.S., Lagerstedt, I., Mir, S., Montecelo, M. A.F., Mukhopadhyay, A., Oldfield, T. J., Patwardhan, A., Sanz-García, E., Sen, S., Slowley, R.A., Wainwright, M.E., Deshpande, M.S., Iudin, A., Sahni, G., Torres, J.S., Hirshberg, M., Mak, L., Nadzirin, N., Armstrong, D.R., Clark, A.R., Smart, O.S., Korir, P.K. & Kleywegt, G.J. PDBe: improved accessibility of macromolecular structure data from PDB and EMDB. *Nucleic acids research* 44: D385-95 (2016). doi:10.1093/nar/gkv1047.
121. Zardecki, C., Dutta, S., Goodsell, D.S., Voigt, M. & Burley, S.K. RCSB Protein Data Bank: A Resource for Chemical, Biochemical, and Structural Explorations of Large and Small Biomolecules. *J. Chem. Educ.* 93: 569–75 (2016). doi:10.1021/acs.jchemed.5b00404.
122. Felli, I.C. & Pieratelli, R. *Intrinsically Disordered Proteins Studied by NMR Spectroscopy*. 1. Auflage. Cham: Springer International Publishing (2015).
123. Kelley, L.A. & Sternberg, M.J. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature protocols* 4: 363–71 (2009).
124. Khor, B.Y., Tye, G.J., Lim, T.S. & Choong, Y.S. General overview on structure prediction of twilight-zone proteins. *Theor Biol Med Model* 12: 15 (2015). doi:10.1186/s12976-015-0014-1.
125. Petrey, D., Chen, T.S., Deng, L., Garzon, J.I., Hwang, H., Lasso, G., Lee, H., Silkov, A. & Honig, B. Template-based prediction of protein function. *Current Opinion in Structural Biology* 32: 33–8 (2015). doi:10.1016/j.sbi.2015.01.007.
126. Schmidt T, Bergner A, Schwede T. Modelling three-dimensional protein structures for applications in drug design. *Drug Discov Today* 2014;19:890–7. doi:10.1016/j.drudis.2013.10.027.
127. Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 2011;27:343–50. doi:10.1093/bioinformatics/btq662.
128. Kryshchuk A, Barbato A, Fidelis K, Monastyrskyy B, Schwede T, Tramontano A. Assessment of the assessment: evaluation of the model quality estimates in CASP10. *Proteins* 2014;82 Suppl 2:112–26. doi:10.1002/prot.24347.
129. Larsson, P., Skwark, M.J., Wallner, B. & Elofsson, A. Assessment of global and local model quality in CASP8 using Pcons and ProQ. *Proteins* 77 Suppl 9: 167–72 (2009). doi:10.1002/prot.22476.
130. Benkert, P., Künzli, M. & Schwede, T. QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic acids research* 37: W510-4 (2009). doi:10.1093/nar/gkp322.
131. Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C., Sasisekharan, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol* 7: 95–9 (1963).

132. Nachbar, M., Mozafari, M., Krull, F., Maul, K.-J., Preu, L., Hara, M., Wätzig, H. Metal ion – dehydrin interactions investigated by affinity capillary electrophoresis and computer models. *Plant Physiol.* 216: 219–228 (2017). doi:10.1016/j.jplph.2017.06.006
133. Vendruscolo, M. Determination of conformationally heterogeneous states of proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 17: 15–20 (2007). doi:10.1016/j.sbi.2007.01.002.
134. Kästner, J. Umbrella sampling. *WIREs Comput Mol Sci* 1: 932–42 (2011). doi:10.1002/wcms.66.
135. Menini, S., Iacobini, C., Blasetti Fantauzzi, C., Pesce, C.M. & Pugliese, G. Role of Galectin-3 in Obesity and Impaired Glucose Homeostasis. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 9618092 (2016). doi:10.1155/2016/9618092.
136. Lehmann, W.D., Wei, J., Hung, C.-W., Gabius, H.-J., Kirsch, D., Spengler, B. & Kübler, D. Effective solvation of alkaline earth ions by proline-rich proteolytic peptides of galectin-3 upon electrospray ionisation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20: 2404–10 (2006).
137. Gillet, L.C., Leitner, A. & Aebersold, R. Mass Spectrometry Applied to Bottom-Up Proteomics: Entering the High-Throughput Era for Hypothesis Testing. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 9: 449–72 (2016). doi:10.1146/annurev-anchem-071015-041535.
138. Shin, T. The pleiotropic effects of galectin-3 in neuroinflammation: a review. *Acta Histochem* 115: 407–11 (2013). doi:10.1016/j.acthis.2012.11.010.
139. Menon, R.P. & Hughes, R.C. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Eur J Biochem* 264: 569–76 (1999). doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00671.x.
140. Nachbar, M., El Deeb, S., Mozafari, M., Alhazmi, H.A., Preu, L., Redweik, S., Lehmann, W.D. & Wätzig, H. Ca²⁺-complex stability of GAPAGPLIVPY peptide in gas and aqueous phase, investigated by affinity capillary electrophoresis and molecular dynamics simulations and compared to mass spectrometric results. *Electrophoresis* 37: 744–51 (2016). doi:10.1002/elps.201500403.
141. Dunbar, R.C., Steill, J.D., Polfer, N.C. & Oomens, J. Metal Cation Binding to Gas-Phase Pentaalanine: Divalent Ions Restructure the Complex. *J. Phys. Chem. A* 117: 1094–101 (2013). doi:10.1021/jp304256f.
142. Dunbar, R.C., Berden, G. & Oomens, J. How does a small peptide choose how to bind a metal ion? IRMPD and computational survey of CS versus Iminol binding preferences. *International Journal of Mass Spectrometry* 354–355: 356–64 (2013). doi:10.1016/j.ijms.2013.07.017.
143. Harding, M.M. & Hsin, K.-Y. Mespeus—a database of metal interactions with proteins. (2011). http://mespeus.bch.ed.ac.uk/MESPEUS_10/. Aufgerufen im November 2014.
144. Harding, M.M. & Hsin, K.-Y. Mespeus—a database of metal interactions with proteins. *Methods Mol. Biol.* 1091: 333–42 (2014). doi:10.1007/978-1-62703-691-7_23.
145. Dechancie, J., Clemente, F.R., Smith, A.J.T, Gunaydin, H., Zhao, Y.-L., Zhang, X. & Houk, K.N. How similar are enzyme active site geometries derived from quantum mechanical theozymes to crystal structures of enzyme-inhibitor complexes? Implications for enzyme design. *Protein Sci.* 16: 1851–66 (2007).
146. Hundertmark, M. & Hincha, D.K. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9: 118 (2008). doi:10.1186/1471-2164-9-118.
147. Dure, L. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal* 3: 363–9 (1993). doi:10.1046/j.1365-313X.1993.t01-19-00999.x.
148. Hara, M., Shinoda, Y., Kubo, M., Kashima, D., Takahashi, I., Kato, T., Horiike, T. & Kuboi, T. Biochemical characterization of the *Arabidopsis* KS-type dehydrin protein, whose gene expression is constitutively abundant rather than stress dependent. *Acta Physiol Plant* 33: 2103–16 (2011).
149. Hara, M. The multifunctionality of dehydrins: An overview. *Plant Signaling & Behavior* 5: 1–6 (2010).

-
150. Hara, M., Fujinaga, M. & Kuboi, T. Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *Journal of Experimental Botany* 56: 2695–703 (2005). doi:10.1093/jxb/eri262.
151. Hara, M., Shinoda, Y., Tanaka, Y. & Kuboi, T. DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion. *Plant, Cell & Environment* 32: 532–41 (2009). doi:10.1111/j.1365-3040.2009.01947.x.
152. Hara, M., Monna, S., Murata, T., Nakano, T., Amano, S., Nachbar, M. & Wätzig, H. The Arabidopsis KS-type dehydrin recovers lactate dehydrogenase activity inhibited by copper with the contribution of His residues. *Plant Sci* 245: 135–42 (2016). doi:10.1016/j.plantsci.2016.02.006.
153. Howton, T.C., Zhan, Y.A., Sun, Y. & Mukhtar, M.S. Intrinsically disordered proteins: controlled chaos or random walk. *Int J Plant Sci* 6: 61 52–57 (2015). doi:10.4081/pb.2015.6191
154. Protein Calculator v3.4 (2013). <http://protecalc.sourceforge.net>. Aufgerufen am 18.11.2016.
155. Snel, B., Lehmann, G. Bork, P. & Huynen, M.A. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic acids research* 28: 3442–4 (2000).
156. Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K.P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L.J. & von Mering, C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research* 43: D447–52 (2015). doi:10.1093/nar/gku1003.
157. Hara, M., Kondo, M. & Kato, T. A KS-type dehydrin and its related domains reduce Cu-promoted radical generation and the histidine residues contribute to the radical-reducing activities. *Journal of Experimental Botany* 64: 1615–24 (2013). doi:10.1093/jxb/ert016.
158. Molecular Operating Environment (MOE). 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada: Chemical Computing Group Inc. (2013).
159. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E. & Berendsen, H.J.C. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 26: 1701–18 (2005). doi:10.1002/jcc.20291.
160. Sun, X. & Lin, H.-H. Role of plant dehydrins in antioxidation mechanisms. *Biologia* 65: 755–9 (2010). doi:10.2478/s11756-010-0090-y.
161. Branduardi, D. How is molecular dynamics being used in life sciences? 1. Schrödinger Life Science Bootcamp Webinar; 11.11.2015.
162. de Ricco, R., Potocki, S., Kozłowski, H. & Valensin, D. NMR investigations of metal interactions with unstructured soluble protein domains. *Coordination Chemistry Reviews* 269: 1–12 (2014). doi:10.1016/j.ccr.2014.02.014.
163. Harding, M.M. Metal-ligand geometry relevant to proteins and in proteins: sodium and potassium. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58: 872–4 (2002).
164. Burger, S.K., Lacasse, M., Verstraelen, T., Drewry, J., Gunning, P. & Ayers, P.W. Automated Parametrization of AMBER Force Field Terms from Vibrational Analysis with a Focus on Functionalizing Dinuclear Zinc(II) Scaffolds. *J. Chem. Theory Comput.* 8: 554–62 (2012). doi:10.1021/ct2007742.
165. Oostenbrink, C., Soares, T.A., van der Vegt, N.F.A. & van Gunsteren, W.F. Validation of the 53A6 GROMOS force field. *Eur Biophys J* 34: 273–84 (2005). doi:10.1007/s00249-004-0448-6.
166. Dunbar, R.C., Steill, J.D., Polfer, N.C., Berden, G. & Oomens, J. Peptide Bond Tautomerization Induced by Divalent Metal Ions: Characterization of the Iminol Configuration. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51: 4591–3 (2012). doi:10.1002/anie.201200437.
167. Roche Registration Limited. Fachinformation Herceptin 150 mg Pulver zur Herstellung eines Infusionskonzentrats. Stand: 19.05.2016.
168. Ohtake, S. & Wang, Y.J. Trehalose: current use and future applications. *J Pharm Sci* 100: 2020–53 (2011). doi:10.1002/jps.22458.
169. Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shelley, M., Perry, J.K., Shaw, D.E., Francis, P. & Shenkin, P. S. Glide: a new approach

-
- for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem* 47: 1739–49 (2004). doi:10.1021/jm0306430.
170. Biologics Suite 2016-2: BioLuminate. New York: Schrödinger (2016).
171. Hartung, J., Elpelt, B. & Klösener, K.-H. Statistik: Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik. 14. Auflage. München: Oldenbourg (2005).
172. Stewart, J.J.P. MOPAC2012. Colorado Springs, Co, USA: James Computational Chemistry (2012).
173. Allouche, A.-R. Gabedit—a graphical user interface for computational chemistry softwares. *J Comput Chem* 32: 174–82 (2011). doi:10.1002/jcc.21600.
174. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. & Ferrin, T.E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605–12 (2004). doi:10.1002/jcc.20084.
175. Harding, M.M. The geometry of metal-ligand interactions relevant to proteins. II. Angles at the metal atom, additional weak metal-donor interactions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56: 857–67 (2000).
176. Stewart, J.J.P. Comments on molecular mechanical corrections for Proteins using MOPAC PM7. <http://openmopac.net/manual/mmok.html> (2013). Aufgerufen im Januar 2015.